

Funktionelle Charakterisierung des *Jmjd1c* Gens in der Adipogenese

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Florian Bürger

Geboren am 01.09.1986 in Potsdam

angefertigt am:

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Universitätsklinikum der Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. Ralph Burkhardt

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

27.02.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einführung.....	1
1.1 Übergewicht und Adipositas.....	1
1.2 Folgeerkrankungen der Adipositas.....	1
1.3 Fettgewebe.....	2
1.4 Adipogenese.....	4
1.4.1 3T3-L1 Zellen	4
1.4.2 Die adipozytäre Transkriptionskaskade.....	5
1.4.3 <i>Mitotic clonal expansion</i> in der frühen Adipogenese	7
1.4.4 Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren	9
1.4.5 Epigenetische Regulation der Adipogenese durch Histon modifizierende Enzyme.....	10
1.5 Die <i>jumonji domain-containing protein</i> Familie.....	12
1.5.1 Beschriebene Funktionen von JmjC Proteinen im Fettgewebe.....	12
1.5.2 JMJD1C.....	13
2 Ziele der Arbeit.....	14
3 Publikationsmanuskript	15
4 Zusammenfassung der Arbeit	24
5 Literaturverzeichnis.....	29
6 Anlagen	34
6.1 <i>Supplemental Material</i>	34
6.2 Erklärung über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden zur Publikation	40
6.3 Selbstständigkeitserklärung.....	41
6.4 Lebenslauf	42
6.5 Publikationen	43
6.6 Danksagung	44

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Adipozytäre Transkriptionskaskade nach Hamm et al.
- Abb. 2 Erweiterte adipozytäre Transkriptionskaskade nach Tang et al. 2012
- Abb. 3 Modell des Eu- und Heterochromatins in Abhängigkeit von
Histonmodifikationen modifiziert nach Jenuwein et Allis 2001

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass-Index
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding proteins</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
DALY	<i>Disability-adjusted life years</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HMT	Histonmethyltransferasen
HR	<i>Hairless</i>
IL	Interleukin
JmjC	<i>Jumonji domain-containing</i>
KLF	<i>Krüppel-like</i> Faktoren
LSD1	<i>Lysine-specific histone demethylase 1A</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein</i> Kinase
MCE	<i>Mitotic clonal expansion</i>
MCP1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
SAT	Subcutaneous adipose tissue
siRNA	Small interfering RNA
TG	Triglyzeride
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WAT	<i>White adipose tissue</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einführung

1.1 Übergewicht und Adipositas

„Fettleibigkeit ist nicht nur selbst eine Krankheit, sondern der Vorbote weiterer Krankheiten“

Hippokrates von Kos (um 460 v. Chr. - 370 v. Chr.)

Übergewicht und Adipositas sind gekennzeichnet durch eine abnormale bzw. exzessive Akkumulation von Fett und die konsekutive Vermehrung von Fettgewebe, einhergehend mit potentiell krankhaften Auswirkungen auch auf eine Vielzahl anderer Organsysteme. Zur Klassifizierung und Diagnosestellung wird der *body mass index* (BMI) als Proportion von Körpergröße und –gewicht verwendet, wobei für Erwachsene ein BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ für Übergewicht und ein BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ für die Diagnose einer Adipositas qualifiziert [1]. Zwischen 1980 und 2015 hat sich die Prävalenz von Adipositas in mehr als 70 Ländern weltweit verdoppelt [2]. So waren 2014 weltweit 39% der Erwachsenen (38% der Männer, 40% der Frauen) übergewichtig und 13% der Erwachsenen (11% der Männer, 15% der Frauen) adipös. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) beschreibt Adipositas als eines der offensichtlichsten und zugleich unterschätztesten Gesundheitsprobleme, das sowohl die sogenannten entwickelten Länder wie auch die Entwicklungsländer bedroht [1]. Ursächlich für Übergewicht und Adipositas ist ein Ungleichgewicht zwischen Kalorienaufnahme und –verbrauch. Hierzu tragen ein Überangebot von (preiswerten) Nahrungsmitteln mit hoher Energiedichte, eine Reduktion der körperlichen Aktivität und genetische Prädispositionen bei [3-6].

1.2 Folgeerkrankungen der Adipositas

Ein erhöhter BMI stellt einen unabhängigen Risikofaktor für verschiedene Komorbiditäten dar. Die relevantesten sind hierbei kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Arthrose und verschiedene Krebserkrankungen [1, 3-5, 7].

Im Jahr 2015 trug Übergewicht ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) zu 4 Millionen Todesfällen weltweit bei. Dies entsprach 7,1% aller Todesfälle. Des Weiteren zeigt sich ein deutlicher Effekt bezüglich der Lebensqualität, welcher sich in 120 Millionen Übergewichts-assoziierten *disability-adjusted life years* (DALYs) ausdrückt. Die DALYs erweitern das Konzept der „verlorenen“ Lebensjahre durch vorzeitigen Tod um Jahre, welche Krankheits-assoziiert in geringerer Lebensqualität verbracht werden.

Kardiovaskuläre Erkrankungen als weltweit häufigste Todesursache sind gleichzeitig die Hauptursache für Todesfälle und DALYs, die im Zusammenhang mit einem hohen BMI stehen (2015 – 2,7 Millionen Todesfälle und 66,3 Millionen DALY) [2, 8].

Prospektive Beobachtungsstudien unterstützen zudem in hohem Maße die Annahme, dass eine kausale Beziehung zwischen einem hohen BMI und malignen Erkrankungen besteht. Suffiziente Daten gibt es hierbei für Malignome des Verdauungstraktes (beispielsweise Ösophagus, Kolon, Leber und Pankreas) sowie der Mamma, des Uterus, der Ovarien, der Nieren und der Schilddrüse [9].

1.3 Fettgewebe

Im Zentrum der Adipositas steht das Fettgewebe, insbesondere das weiße Fettgewebe (WAT - *white adipose tissue*). Dieses wurde lange Zeit als reines Depotsystem betrachtet. Ein biologisches Reservoir, das in Zeiten des Überangebots von Nährstoffen Energie in Form von Lipiden – vorrangig Triglyzeriden – speichert und diese Energie dem Organismus im Bedarfsfall wieder zur Verfügung stellen kann. In den vergangenen drei Jahrzehnten hat sich unser Bild des Fettgewebes und dessen zellulärer Einheit – der Adipozyten – jedoch deutlich erweitert [10]. Das Fettgewebe mit den von ihm sezernierten bioaktiven Molekülen – den Adipokinen – muss nun viel mehr als ein endokrines und parakrines Organ betrachtet werden muss. Adipokine beeinflussen dabei nicht nur den Energiestoffwechsel und die Homöostase des Körpergewichts sondern agieren auch als Mediatoren im Rahmen von Inflammation, Gerinnung, Fibrinolyse, Insulinsensitivität, Diabetes und Arteriosklerose [11]. Im Zuge der Differenzierung von fibroblastären Präadipozyten zu reifen Adipozyten gewinnen die Zellen die

Fähigkeit hunderte Proteine wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu synthetisieren und zu sezernieren [12, 13] und der Fundus dieser Moleküle erweitert sich stetig [14].

Die komplexen Interaktionen zwischen diesen Molekülen und die zellulären Mechanismen, über die Adipositas die Entwicklung von Atherosklerose und Diabetes mellitus beeinflusst, sind jedoch bisher nur ansatzweise verstanden.

Auch bezüglich der Struktur und Lokalisation hat der Begriff des Fettgewebes eine Erweiterung erfahren. So konnte neben dem seit langem bekannten braunen und weißen Fettgewebe der Typus des beigen Fettgewebes identifiziert und etabliert werden [15]. Weiterhin ist innerhalb des weißen Fettgewebes die Differenzierung zwischen subkutanem (SAT - *subcutaneous adipose tissue*), viszeralem (VAT - *visceral adipose tissue*) und ektopem Fettgewebe entscheidend. Eine Vielzahl der bereits oben angeführten Komorbiditäten zeigt eine prädominante Korrelation mit einem Exzess von viszeralem gegenüber subkutanem Fettgewebe [16-18]. Zentrale Adipositas mit einem Exzess von viszeralem sowie abdominellem subkutanem Fettgewebe zeigt eine deutliche Korrelation mit metabolischen Komplikationen der Adipositas. Hingegen scheint eine vorrangige Fettakkumulation in der gluteo-femoralen Körperregion sogar einen protektiven Effekt gegenüber diesen Komplikationen zu besitzen [19]. Kein anderes nicht-neoplastisches Gewebe zeigt eine so ausgeprägte Fähigkeit zur Veränderung der eigenen Dimensionen wie das Fettgewebe. Bei der Akkumulation von Fettgewebe kann eine Rekrutierung neuer Adipozyten aus den Vorläuferzellen (Hyperplasie) von einer Vergrößerung des individuellen Adipozyten (Hypertrophie) unterschieden werden. Insbesondere die adipozytäre Hypertrophie ist mit vermehrtem intrazellulärem Stress, Gewebsinflammation und Dysfunktion des Fettgewebes assoziiert. Die erhöhte Sekretion von Adipokinen und Metaboliten, welche proinflammatorische (Interleukin 1 β , Interleukin 6, Tumornekrosefaktor- α (TNF α)) sowie diabetogene (Resistin, Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1), TNF α) und atherogene (TNF α , Leptin, Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)) Eigenschaften haben, führt zu entsprechenden systemischen Wirkungen und trägt zu weiterer Inflammation und Gewebsschäden im Fettgewebe wie auch in anderen Geweben (Leber, Endothelium etc.) bei [20]. Interessanterweise gibt es ein unterschiedliches Profil von Adipokinen zwischen VAT und SAT. So ist die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (wie IL-6, IL-8 u.w.) im viszeralen generell

ausgeprägter als im subkutanen Fettgewebe. Ein verändertes Adipokinprofil sowie die erhöhte Zirkulation freier Fettsäuren tragen zur systemischen Inflammation und den metabolischen Komplikationen der Adipositas bei [19, 21].

1.4 Adipogenese

Adipozyten entwickeln sich aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC). Auf der molekularen Ebene lassen sich hierbei zwei Phasen unterscheiden [22]. In der ersten Phase erfolgt die Festlegung (engl. *commitment phase*) der pluripotenten Zellen auf die adipozytäre Zellreihe. Der entstandene sogenannte Präadipozyt kann rein morphologisch nicht von einer mesenchymalen Vorläuferzelle unterschieden werden, hat aber bereits die Fähigkeit zur Differenzierung in andere Subgewebstypen der mesenchymalen Reihe verloren. In der zweiten, terminalen Differenzierungsphase erwirbt die Zelle den zellulären Syntheseapparat für Lipidverarbeitung und -transport, Rezeptoren für beispielsweise Insulin und die Sekretion von Adipokinen [23]. Für *in vitro* Untersuchungen der Adipogenese und daran beteiligter Moleküle hat sich der Einsatz etablierter Zelllinien (C3H10T1/2, OP9, 3T3-L1, SGBS) bewährt. Hierbei werden in der Regel stromale oder präadipozytäre Zellmodelle genutzt.

1.4.1 3T3-L1 Zellen

Die Anfang der 1960er Jahre isolierte murine 3T3-Zelllinie etablierte sich in kurzer Zeit als fibroblastäre Standardzelllinie. In der Sublinie 3T3-L1 konnte in den 1970er Jahren beobachtet werden, dass diese Zellen nach Erreichen eines Ruhezustandes beginnen Triglyzeride zu akkumulieren. Unter dem Einsatz spezifischer Stimulantien sowie der Schaffung eines Milieus, das unter anderem fetales Kälberserum (FKS) beinhaltet, konnte dieser Prozess noch verstärkt werden und die 3T3-L1 Zelllinie etablierte sich als eine der Standardzellreihen für Untersuchungen zur adipozytären Differenzierung [24]. Die Validität des 3T3-L1 Zellsystems als Modell für die Adipogenese konnte im Verlauf durch vielfältige weiterführende Studien in murinen

und humanen Geweben bestätigt werden [25]. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass sich Präadipozyten einer 3T3 Zellkulturlinie bei Implantation in thymusaplastische Mäuse und ohne die Verwendung exogener Induktoren in Fettgewebe differenzieren, das vom physiologischen Fettgewebe der Mäuse nicht diskriminiert werden kann [26].

1.4.2 Die adipozytäre Transkriptionskaskade

Die adipozytäre Differenzierung ist ein streng kontrollierter Prozess, der durch die zeitlich feinabgestimmte Expression und Induktion einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Am Ende dieser Kaskade stehen zahlreiche Genprodukte, welche u.a. den transmembranösen Transport von Glukose und Fettsäuren sowie die Synthese und Speicherung von Triglyzeriden in Form von Lipidtröpfchen ermöglichen und somit den adipozytären Phänotyp generieren.

Eine zentrale Rolle spielen hierbei der *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) und verschiedene Mitglieder der *CCAAT-enhancer binding proteins* (C/EBP) Familie. Eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien hat PPAR γ als zentralen Regulator der Adipogenese etabliert und gezeigt, dass PPAR γ nicht nur eine notwendige sondern auch hinreichende Bedingung für eine suffiziente Differenzierung zu Adipozyten ist [23, 27]. Durch Nutzung eines alternativen Startcodons und alternativem Splicing entstehen zwei verschiedene Isoformen von PPAR γ , wobei PPAR γ 1 eher ubiquitär und PPAR γ 2 nahezu ausschließlich im Fettgewebe exprimiert wird. Der zweite, bereits früh identifizierte, zentrale Regulator der Adipogenese ist C/EBP α . Für beide Faktoren konnte demonstriert werden, dass eine ektopische oder forcierte Expression in Fibroblasten jeweils zur Induktion der Adipogenese führt und das ein Abschalten des jeweiligen Gens (via *knock-out*) die Differenzierung zu weißem Fettgewebe vollständig blockiert [25, 28-30]. Interessanterweise scheint dennoch eine Rangfolge zwischen beiden Faktoren zu bestehen, in der PPAR γ hierarchisch übergeordnet ist. PPAR γ ist in der Lage in C/EBP α defizienten Fibroblasten eine suffiziente Adipogenese zu induzieren, während C/EBP α in Abwesenheit von PPAR γ unfähig ist, die Differenzierung einzuleiten [31]. C/EBP α ist dennoch entscheidend an der terminalen Adipogenese

und der Funktion der Adipozyten beteiligt, indem es verschiedene adipozytäre Gene direkt induziert, die Expression von PPAR γ in reifen Adipozyten aufrechterhält und kritisch für die physiologische Insulinsensitivität der Adipozyten ist [23, 32, 33].

Als etabliert gelten mit C/EBP β und C/EBP δ außerdem zwei weitere Vertreter der C/EBP Familie, die bereits zu Beginn der Adipogenese exprimiert werden und die Expression von PPAR γ und C/EBP α induzieren. Die Beobachtung, dass ein einzelner *knock-out* dieser Gene nur einen moderaten Effekt auf die Entwicklung des Fettgewebes hat, ein kombinierter jedoch zu einer drastischen Reduktion der Differenzierung führt, zeigt zum Einen die Relevanz von C/EBP β und C/EBP δ für die Adipogenese. Zum Anderen verdeutlicht es, dass eine zumindest teilweise redundante Funktion der Genprodukte von C/EBP β und C/EBP δ vorzuliegen scheint [34].

Das Grundgerüst der adipogenen Transkriptionskaskade lässt sich daher, wie in Abb.1 dargestellt, zusammenfassen. Als Reaktion auf physiologische Effektoren, wie Insulin, Glukokortikoide und Agonisten, die cyclisches AMP (cAMP) erhöhen, werden in den Präadipozyten C/EBP β , C/EBP δ und PPAR γ 1 induziert. C/EBP β und C/EBP δ stimulieren wiederum die Expression von PPAR γ 2 und C/EBP α sowie einen Signalweg, der zur Produktion von PPAR γ Liganden führt. Die ligandenvermittelte Aktivierung von PPAR γ 1 und PPAR γ 2 bewirkt eine direkte Induktion von C/EBP α und erzeugt somit einen *positive feedback loop* (positive Rückkopplungsschleife), in welchem sich PPAR γ 2 und C/EBP α über regulatorische Elemente in ihren Promotoren wechselseitig aktivieren. Über das gleiche Prinzip werden in koordinierter Weise die Promotoren eines Großteils der adipozytären Effektorgene (trans-) aktiviert [23, 35-37].

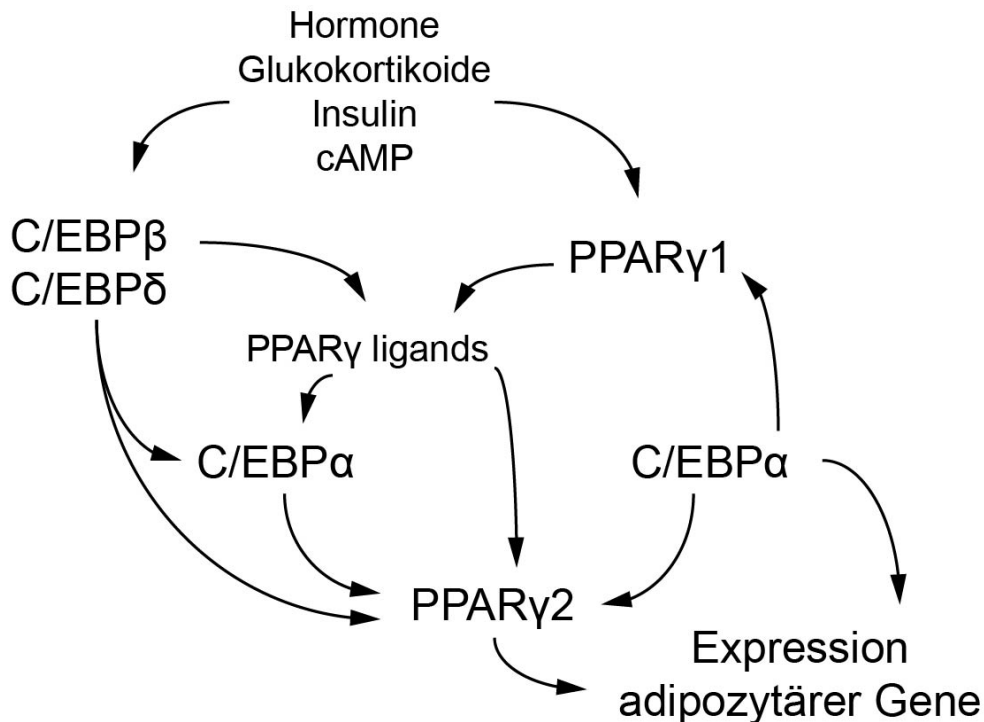


Abb.1 Adipozytäre Transkriptionskaskade nach Hamm et al.

1.4.3 Mitotic clonal expansion in der frühen Adipogenese

Wie bereits unter 1.4.2 beschrieben erfolgt die Expression von C/EBPβ und C/EBPδ bereits kurz nach Induktion der Differenzierung (<4h) [25, 38]. Interessanterweise erfolgt jedoch die C/EBPβ vermittelte direkte Aktivierung von PPARγ und C/EBPα (via C/EBP-regulatorische Elemente in deren proximalen Promotoren) erst nach 16-20h [39, 40]. Die Inaktivität von C/EBPβ im Zeitraum bis ca. 16h wird durch dessen fehlende DNA-Bindungsfähigkeit bedingt. Zur Erlangung dieser DNA-Bindungsfähigkeit ist eine zweizeitige Phosphorylierung von C/EBPβ (durch MAPK und GSK3β) notwendig [41]. In diesem Kontext kommt das Konzept der *mitotic clonal expansion* (MCE) zum tragen.

Postkonfluente 3T3-L1 Präadipozyten, welche sich in einem reversiblen Wachstumsarrest befinden, werden durch die Zugabe von adipogenen Substanzen stimuliert und treten hiermit in die Induktionsphase der Differenzierung ein. In den ersten drei Tagen vollziehen die Zellen synchronisiert zwei sequentielle Zellzyklus-Passagen im Sinne einer Mitose. Diese spezielle Form der Mitose wird auch als *mitotic clonal expansion* (MCE) bezeichnet. Nach Abschluss der zweiten Mitose ist

die Zellzahl circa vervierfacht und bleibt im weiteren Verlauf konstant – die Zellen befinden sich nun in einem postmitotischen irreversiblen Wachstumsarrest. Beim Passieren des G1-S Kontrollpunktes während der ersten Mitose (nach ca. 16h) erlangt C/EBP β durch die zweite Phosphorylierung die DNA-Bindungsaktivität [36, 39]. In zeitlich enger Korrelation zu diesen Vorgängen findet eine koordinierte Expression von Zellzyklusproteinen statt [42].

Die Relevanz dieses Prozesses wird dadurch verdeutlicht, dass Substanzen, die die Zellzyklusprogression stören, MCE blockieren und die Adipogenese vollständig verhindern [43]. Weiterhin arretiert eine siRNA vermittelte Herabregulation von C/EBP β die Zellen in der G1 Phase, was wiederum die MCE und die darauf folgende Adipogenese hemmt [44].

Abb.2 zeigt schematisch eine Erweiterung der in Abb.1 dargestellten Transkriptionskaskade, die die Aspekte der MCE und der Aktivierung von C/EBP β miteinbezieht.

Inwiefern die mit MCE assoziierten Prozesse im Allgemeinen relevant für die Adipogenese sind, ist aktuell noch nicht vollständig geklärt. Gleiche Abläufe sind für die 3T3-F442A Zelllinie, MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) sowie für primäre murine Präadipozyten, nicht aber beispielsweise für die C3H10T1/2 Zelllinie nachgewiesen [41, 45].

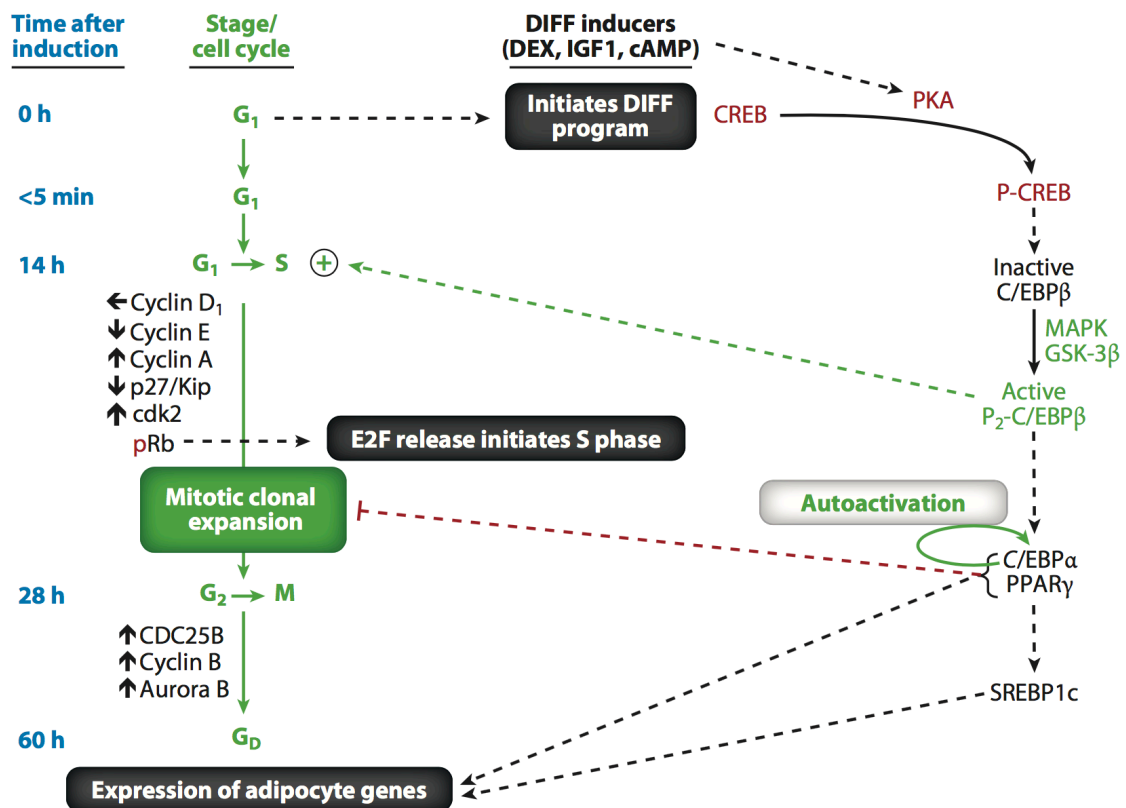


Abb.2 Erweiterte adipozytäre Transkriptionskaskade nach Tang *et al.* 2012

Schematische Darstellung der adipozytären Transkriptionskaskade unter Einbezug der zeitlichen Abfolge, Rekrutierung von Cyklinen und der Zellzyklusprogression. Blau = Zeitpunkte nach Induktion der Differenzierung. Grün = Phasen des Zellzyklus bzw. Transition der Phasen und Zeitpunkt des *mitotic clonal expansion*. Schwarz = Relevante Schritte der Differenzierung mit Aktivierung und Induktion der wichtigsten Faktoren.

1.4.4 Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren

Die koordinierte Aktivierung von PPARγ und C/EBPα bildet gewissermaßen die *conditio sine qua non* für die Adipogenese. Die Feinregulation dieses Prozesses wird jedoch durch eine Vielzahl von positiv und negativ wirkenden Effektoren realisiert. Diese können sowohl in den frühen Phasen der klonalen Expansion wie auch im Verlauf der Adipozytendifferenzierung bis hin zum Übergang in die terminale Differenzierung zum reifen Adipozyten wirken. Ein Großteil dieser Effektoren sind Transkriptionsfaktoren, die durch direkte Bindung an die DNA wirken.

Kofaktoren sind nukleäre Faktoren, die nicht direkt an die DNA binden, sondern Komplexe formen und in diesen die Bindung der Transkriptionsfaktoren zur DNA und der basalen Transkriptionsmaschinerie entweder fördern oder hemmen.

In Übereinstimmung mit den zuvor genannten Beobachtungen zu PPAR γ zeigt sich, dass die meisten proadipogenen Faktoren mittels einer Induktion der PPAR γ Expression oder Aktivität und die meisten antiadipogenen Faktoren mittels einer partiellen Hemmung von PPAR γ wirken.

Exemplarisch seien hier die Familie der *Krüppel-like* Faktoren (KLF), das *early growth response protein* (EGR2/Krox20), die GATA Transkriptionsfaktoren, das *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP1c, ADD1 = murines Homolog) und PPAR interagierende Protein PRIP genannt [23, 46].

1.4.5 Epigenetische Regulation der Adipogenese durch Histon modifizierende Enzyme

Neben der bereits erwähnten Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und deren Assoziation in Komplexen mit Koeffektoren sind auch epigenetische Mechanismen an der Adipogenese beteiligt (Musri 2009). Die Chromatinfäden im Zellkern liegen, je nach Aktivitätsstatus, in verschiedenen Formen der Kondensation vor, welche durch ein mehrschrittiges System von Faltungen realisiert wird. Die N-terminalen Reste der Histonproteine und deren posttranslationale Modifikation sind bei diesen Prozessen von entscheidender Bedeutung [47, 48]. Der Zusammenhang von spezifischen Histonmodifikationen im Chromatin eines bestimmten Genes mit dessen Transkriptionsstatus konnte mittlerweile vielfach und überzeugend gezeigt werden. So führen beispielsweise Acetylierungen von Lysinresten zu einer Genaktivierung, während Histon-Methylierungen (Mono-, Di- und Tri-Methylierungen) je nach Lokalisation und Kontext im Sinne der Histon-Code Hypothese zu verschiedenen Resultaten führen können [49, 50]. Typischerweise sind Methylierungen am Lysinresiduum 4 von Histon 3 (H3K4me), H3K36 und H3K79 mit transkriptionell aktiven Regionen assoziiert. Methylgruppen an H3K9, H3K27 und H4K20 hingegen führen in der Regel zu einer Herabregelung der Transkription („silencing“) in den räumlich assoziierten Promotorbereichen [51-53].

Die verschiedenen Histonmodifikationen werden durch spezifische Enzyme wie Histonacetyltransferasen (HAT), Histondeacetylasen (HDAC) sowie durch Histonmethyltransferasen (HMT) und Histondemethylasen katalysiert.

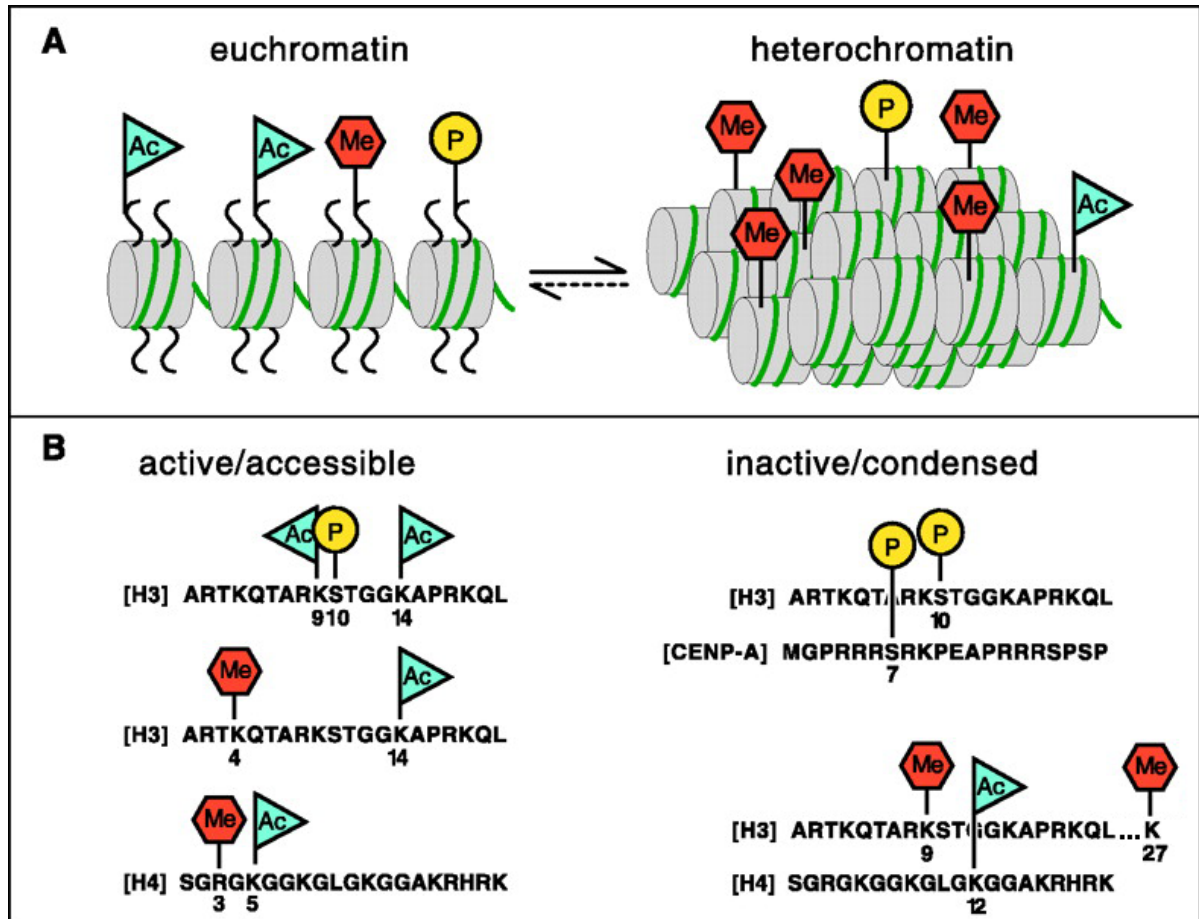


Abb.3 Modell des Eu- und Heterochromatins in Abhängigkeit von Histonmodifikationen modifiziert nach Jenuwein & Allis 2001

(A) Schematische Darstellung von Eu- und Heterochromatin als aktive/ablesbare (links) sowie inaktive/kondensierte und damit nicht ablesbare Variante (rechts). Beispielhafte Illustration mit acetylierten (Ac), methylierten (Me) und phosphorylierten (P) NH₂-Gruppen. (B) Exemplarische Darstellung von Kombinationen von Histonmodifikationen, die mit aktivem oder inaktivem Chromatin assoziiert sind.

In der Adipogenese sind diese Mechanismen sowohl während der *Commitment* Phase (siehe auch 1.3), als auch während der Differenzierung der Präadipozyten zu reifen Adipozyten relevant. Regulatoren, die die Festlegung (*Commitment*) auf eine Entwicklungsreihe induzieren, inhibieren meistens die Differenzierung in andere Entwicklungsreihen.

Im Verlauf der Differenzierung der Präadipozyten zu reifen Adipozyten konnten bereits verschiedene epigenetische Prozesse, welche eine Wirkung auf die Effizienz der Differenzierung haben, experimentell belegt werden [54]. In vielen Fällen ist hierbei eine Beeinflussung der Promotoren und damit der transkriptionellen Aktivität von C/EBP α und PPAR γ der entscheidende Mechanismus. Exemplarisch sei hier die Histondemethylase LSD1 genannt, die als duale Demethylase an H3K4/K9, sowohl aktivierend wie auch inhibierend wirken kann. In verschiedenen Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von LSD1 zu einer drastischen Reduktion der Adipogenese führt und dass dieser Effekt teilweise über höhere Level der reprimierenden H3K9-Methylierungen im Promotorbereich von C/EBP α bewirkt wird [55].

1.5 Die *jumonji domain-containing protein* Familie

Die *jumonji C (JmjC)-domain-containing* Proteinfamilie stellt die größte Gruppe der Histondemethylasen mit mindestens 30 identifizierten nicht redundanten Proteinen dar [56]. Die durch JmjC Proteine katalysierte Demethylasereaktion ist kompatibel mit mono-, di- und trimethylierten Lysinen sowie mit methylierten Argininen an Histonen und anderen Proteinsubstraten oder Nukleotiden [57, 58].

Für viele Vertreter der JmjC Proteinfamilie konnte bereits experimentell eine Histondemethylaseaktivität gezeigt werden. Einige JmjC Proteine scheinen diese Aktivität dabei nur in einem bestimmten Milieu von Kosubstraten zu entfalten oder sogar selbst als Kofaktoren in der Demethylierung von Histonen und anderen Proteinen zu agieren [56, 57, 59].

1.5.1 Beschriebene Funktionen von JmjC Proteinen im Fettgewebe

Für JmjC Proteine wurde eine Beteiligung an verschiedenen zellulären Differenzierungsprozessen, wie etwa der Spermatogenese, sowie der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen beschreiben [57, 59, 60].

Für einige JmjC Proteine konnte außerdem bereits eine Rolle in der Adipogenese oder im Rahmen der Adipositas demonstriert werden. So ist JMJD2B in das *Commitment* von MSC (siehe auch Abschnitt 2.3) involviert und kann zwischen Osteoblastogenese und Adipogenese differenzieren [61]. Als ein Zielgen von C/EBP β moduliert JMJD2B außerdem die MCE und die terminale Differenzierung von 3T3-L1 Zellen [62].

Für JMJD1A konnte eine Funktion in der Energiehomöostase nachgewiesen werden. JMJD1A reguliert die Expression verschiedener metabolischer Gene in Fett- und Muskelgewebe [63, 64]. Ein *Knock-out* von *Jmjd1a* in Mäusen führt zu einem Adipositasphänotyp mit Hyperlipidämie, Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie [65]. Mechanistisch wurde hierbei aufgeklärt, dass JMJD1A direkt die PPAR-Signaltransduktion reguliert [64].

Das JmjC Protein *Hairless* (HR) wurde ebenfalls als wichtiger proadipogener Kofaktor von PPAR γ identifiziert und ist sogar in der Lage, bei Überexpression in nicht adipogenen Zellreihen deren Potential zur Adipogenese zu erhöhen [66]. Ferner fördert JMJD6 die Adipogenese, indem es an der posttranskriptionellen Regulation von C/EBP β und C/EBP δ beteiligt ist sowie PPAR γ 2 und C/EBP α direkt transkriptionell aktiviert [67].

1.5.2 JMJD1C

Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte JMJD1C ist ein weiteres Mitglied der JmjC Protein Familie, welches bisher vorrangig im Kontext der Spermatogenese und bei verschiedenen malignen Erkrankungen untersucht wurde.

JMJD1C ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Pools von spermatogonalen Stammzellen und an der transkriptionellen Regulation der Differenzierung der Keimbahnzellen beteiligt. Hierbei erzeugt JMJD1C als funktioneller Gegenspieler der Histonmethyltransferase WHISTLE ein Gleichgewicht des Histonmethylierungsstatus [68, 69]. Die kritische Funktion der Aufrechterhaltung der Stammzellen für die Gametogenese konnte in einer weiteren Studie mit *Jmjd1c*-defizienten Mäusen bestätigt werden.

In dieser wurden die Versuchstiere durch eine progressive Reduktion der Keimbahnzellen nach dem dritten Lebensmonat infertil [70].

In humanen embryonalen Stammzellen konnte JMJD1C als Teil eines regulatorischen Netzwerkes identifiziert werden, das die neuronale Differenzierung inhibiert, indem es H3K9 an einem Locus demethyliert, der mit Pluripotenz assoziiert ist. Die Demethylierung und konsekutive Aktivierung des Locus führt zum Erhalt der Pluripotenz und verhindert wiederum die spezialisierte neuronale Differenzierung [71].

Ferner konnte gezeigt werden, dass JMJD1C über seine Histondemethylase-Aktivität an H3K9 wichtige Expressionsprogramme zur Beschleunigung der Zellteilung und Inhibition der Zelldifferenzierung bei akuten myelischen Leukämien aktiviert [72]. Die Expansion und Koloniebildung leukämischer Zellen konnte hingegen durch eine *Jmjd1c* Depletion unterdrückt werden [73].

Vor kurzem lieferten genomweite Assoziationsstudien erstmals Belege für eine potentielle Funktion von JMJD1c im Lipidstoffwechsel: Genvarianten am JMJD1C-Lokus waren mit der Konzentration der Plasma-Triglyzeride assoziiert [74-76].

2 Ziele der Arbeit

Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe, sowie Ergebnisse genomweiter Assoziationsstudien haben erste Hinweise für eine Funktion von JMJD1C im Stoffwechsel ergeben. In der vorliegenden Arbeit sollte daher erstmals die Bedeutung von JMJD1C für die Adipogenese und den adipozytären Metabolismus experimentell untersucht werden.

Hierzu sollten:

1. Die Expression von *Jmjd1c* in metabolisch relevanten Geweben charakterisiert werden.
2. Ein adipozytäres Zellmodell mit *Jmjd1c* -Depletion etabliert werden.
3. Die funktionellen Auswirkungen einer *Jmjd1c* -Depletion auf die Adipogenese und den Zellphänotyp untersucht werden.
4. Potentielle Mechanismen des beobachteten Phänotyps exploriert werden.

Depletion of *Jmjd1c* impairs adipogenesis in murine 3T3-L1 cells

Florian Buerger^{a,b}, Silvana Müller^{a,b}, Nadja Ney^{a,b}, Juliane Weiner^c, John T. Heiker^c, Sonja Kallendrusch^d, Peter Kovacs^c, Dorit Schleinitz^c, Joachim Thierry^{a,b}, Sonja C. Stadler^{a,b}, Ralph Burkhardt^{a,b}

Author Affiliations:

^aInstitute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, 04103 Leipzig, Germany.

^bLIFE-Leipzig Research Center for Civilization Diseases, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany.

^cLeipzig University Medical Center, Integrated Research and Treatment Centre Adiposity Diseases, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany.

^dInstitute of Anatomy, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany

Corresponding Author:

Ralph Burkhardt, MD; Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Liebigstr. 27, 04103 Leipzig, Germany, email: ralph.burkhardt@medizin.uni-leipzig.de, phone: +49 341 9722200

Short Title: Jmjd1c depletion impairs adipogenesis

Conflict of interest: All authors declare no conflicts of interest.

Highlights

- We identified *Jmjd1c* as a novel regulator of adipogenesis
- Depletion of *Jmjd1c* leads to smaller lipid droplets and reduced triglyceride content
- Insulin stimulated uptake of glucose and fatty acids is reduced in 3T3-L1 adipocytes differentiated under depletion of *Jmjd1c*
- Depletion of *Jmjd1c* impairs mitotic clonal expansion during early adipogenesis and reduces the induction of adipogenic transcription factors via epigenetic mechanisms

Abstract

Differentiation of adipocytes is a highly regulated process modulated by multiple transcriptional co-activators and co-repressors. JMJD1C belongs to the family of jumoni C (jmc) domain-containing histone demethylase enzymes and was originally described as a ligand-dependent co-activator of thyroid hormone and androgen receptors. Here, we explored the potential role of *Jmjd1c* in white adipocyte differentiation. To investigate the relevance of *Jmjd1c* in adipogenesis, murine 3T3-L1 preadipocyte cells with transient knock-down of *Jmjd1c* (3T3_3Jmjd1c) were generated. Depletion of *Jmjd1c* led to the formation of smaller lipid droplets, reduced accumulation of triglycerides and maintenance of a fibroblast-like morphology after adipocyte differentiation. Concomitantly, insulin stimulated uptake of glucose and fatty acids was significantly reduced in 3T3_3Jmjd1c adipocytes. In line with these observations we detected lower expression of key genes associated with lipid droplet formation (*Plin1*, *Plin4*, *Cidea*) and uptake of glucose and fatty acids (*Glu4*, *Fatp1*, *Fatp4*, *Aqp7*) respectively. Finally, we demonstrate that depletion of *Jmjd1c* interferes with mitotic clonal expansion (MCE), increases levels of H3K9me2 (dimethylation of lysine 9 of histone H3) at promoter regions of adipogenic transcription factors (C/EBPs and PPAR γ) and leads to reduced induction of these key adipogenic regulators. **In conclusion** we have identified *Jmjd1c* as a modulator of adipogenesis. Our data suggest that JMJD1C may participate in MCE and the activation of the adipogenic transcription program during the induction phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells.

Keywords: adipogenesis, WAT, mitotic clonal expansion, jumoni, histone modification, H3K9me2

1. Introduction

Obesity is associated with a variety of comorbidities such as cardiovascular disease, diabetes and several types of cancer. Alarmingly, the worldwide number of obese people has doubled in the past three decades [1-5]. In adult humans, white adipose tissue (WAT) is the main type of fat tissue and its development – adipogenesis – is a highly complex process involving many actors, which are still not well understood. Identifying new actors and their respective function in adipogenesis will generate a better understanding of adipose tissue physiology and may eventually lead to the development of new therapeutic approaches. Adipogenesis itself can be divided into two phases, the commitment phase and the terminal differentiation phase [6]. It is well-described that the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family of transcription factors and Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) act as key regulators in the transcriptional process of adipogenesis. C/EBP δ and C/EBP β represent the main actors of the ‘commitment’ phase and activate PPAR γ , which in turn promotes C/EBP α . Jointly the two latter induce numerous adipocyte-specific genes and represent the ‘terminal differentiation’ phase [7-9]. This system of transcription factors is further precisely orchestrated by a complex network of co-activators and co-repressors [6; 2].

The jumoni domain containing (jmc) gene family has been described to regulate various transcriptional processes via a specific histone demethylase activity [10]. The jmc family represents the third and largest discovered class of demethylase enzymes yet. Several lines of evidence link members of the jmc family with adipocyte biology. For example it has been demonstrated that *Jmjd1a* is crucially involved in energy homeostasis and that *Jmjd1a* knock-out mice exhibit an obesity phenotype [11]. The jmc gene and transcriptional cofactor hairless (HR) is required for white fat cell development and conducts its pro-adipogenic potential by promoting PPAR γ expression [12]. Further, JMJD6 was shown to promote adipogenic gene expression by post-transcriptional regulation of C/EBP δ and C/EBP β and also via direct transcriptional activation of PPAR γ 2 and C/EBP α during adipocyte differentiation [13].

JMJD1C is another member of the jmc family and has been mainly implicated in germ cell development and cancer [14-17]. It has been demonstrated to function as a histone demethylase that removes methyl groups from H3K9me2 (dimethylation of lysine 9 of histone H3) and thereby regulates transcriptional activity of target genes [15; 16; 18]. Furthermore, genome-wide association studies identified variants at the *JMJD1C* locus to be associated with plasma triglyceride levels [19-21]. However, experimental studies addressing

the role of JMJD1C in metabolism are lacking as of now. Since JMJD1C regulates cell developmental processes and closely related genes have been tied to adipocyte biology, we decided to investigate a potential role of JMJD1C in adipogenesis and adipocyte metabolism.

Here, we used murine preadipocyte 3T3-L1 cells and siRNA mediated knock-down to study the role of *Jmjd1c* in adipogenesis. Depletion of *Jmjd1c* in 3T3-L1 cells resulted in smaller lipid droplets and impaired uptake of glucose and fatty acids in differentiated adipocytes. The results of our study indicate that *Jmjd1c* is a regulator of properly functioning adipogenesis.

2. Materials and Methods

2.1 Cell Culture and in vitro differentiation

Murine 3T3-L1 cells purchased from ATCC were cultivated in DMEM (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (Biocrom) at 37°C and 5% CO₂. 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes as previously described [22]. Briefly, differentiation was induced by treating two days post-confluent cells with DMEM, 10% FBS, 0.5mM IBMX, 0.25μM Dexamethasone, 1μg/ml Insulin, 2μM Rosiglitazone. On day 3 the media was switched to DMEM, 10% FBS, 1μg/ml Insulin. From day 6 onwards cells were cultured under standard conditions. Subsequent experiments were carried out in fully differentiated cells on day 8.

2.2 Transient knock-down of JMJD1c

Three days before induction of the adipogenic differentiation 3T3-L1 cells were reverse transfected using Silencer select siRNA (Ambion, Cat# 4390771) at a final concentration of 10nM and Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Transfection reagent and siRNA were incubated in OptiMEM (Life Technologies) in order to form liposomes prior to addition of cells. All transfections were performed using *Jmjd1c* specific siRNAs (ID s99299 (used for all experiments) and ID s99297 (used as independent siRNA to replicate results; Supplemental Figure A.3)) as well as non-targeting control siRNA and mock transfections containing no siRNA as controls and reference, respectively.

2.3 RNA isolation and quantitative real-time PCR

Snap-frozen tissues of C57BL/6 mice were homogenized using a Precellys24 (Bertin Technologies) cell homogenizer. Total RNA of tissues and 3T3-L1 cells was then extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) or TRIzol reagent (Invitrogen). 1μg of RNA was reverse

transcribed with Superscript II (Thermo Fisher). Quantitative real-time PCR was performed on an ABI Viia 7 System (Applied Biosystems) using the HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biotec) as fluorescent DNA stain. All samples were analyzed in triplicates. Relative expression levels of mRNA were quantified with the comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$) method. All primer sequences are provided in Appendix Table 1 & 2.

2.4 Preparation of cellular fractions for Western Blot analysis

Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared as described by Dignam et al. [23]. Protein concentration was determined using the Pierce BCA Kit. Proteins (25-35μg) were separated by SDS-PAGE in NuPage 4-12% gradient gels (Invitrogen) followed by blotting on PVDF membranes. The membranes were probed with the following antibodies: Anti-C/EBPβ (C-19 Santa Cruz), Anti-PPARγ (C26H12, Cell Signaling), Anti-C/EBPδ (#2318, Cell Signaling), Anti-Phospho-C/EBPβ (#3084, Cell Signaling), Anti-TBP (#8515, Cell Signaling).

2.5 Quantification of cellular triglyceride content

Cellular lipids of differentiated 3T3-L1 adipocytes were extracted using Hexane:Isopropanol (3:2 - vol:vol) [24]. The Triglyceride content was quantified using the GPO-PAP method (Roche/Hitachi 11730711). Total cellular protein content was determined using the Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher) and used for data normalization.

2.6 Fatty acid and glucose uptake assays in 3T3-L1 adipocytes

Mature 3T3-L1 adipocytes were incubated in serum-free media for 1h. Fatty acid uptake was then assessed using the QBT fatty acid uptake Kit (Molecular Devices) following the manufacturer's instructions. Fluorescent signal was measured on a Variokan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific). For assessment of glucose uptake cells were incubated in serum-free media overnight and starved in low-glucose DMEM (1mg/ml glucose) 1h prior to the experiment. Cells were then incubated with Krebs-Ringer-Hepes buffer (12 mM NaCl, 0.6 mM KCl, 120 μM KH₂PO₄, 120 μM MgSO₄·7H₂O, 100 μM CaCl₂, 20 mM Hepes, 0.1% (wt/vol) BSA) containing ³H-Deoxy-D-glucose (NET549A001MC, Perkin Elmer) at an activity of 18.5kBq/ml for 30min, lysed with RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% (vol/vol) Triton X-100 (Sigma), 0.5% (wt/vol) Sodium deoxycholate, 0.1% (wt/vol) Sodium dodecyl sulfate, Proteinase inhibitor cocktail cOmplete (Roche)) and the lysates were transferred to scintillation vials. The activity was determined in a beta counter (Perkin Elmer). Both fatty acid and glucose uptake experiments were assessed under basal and insulin stimulated (100nM insulin (Sigma), 15min) conditions. Total cellular

protein content was determined using the Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher) and used for data normalization.

2.7 Confocal imaging of 3T3-L1 adipocytes

Lipid droplets were stained with Nile Red stain (AdipoRed, Lonza). 3D stack imaging of 3T3-L1 adipocytes was performed using a FV 1000 confocal laser scanning microscope (Olympus) equipped with an incubation chamber and a motorized table. Numbers and volumes of the lipid droplets were then quantified with the ImageJ software (Rasband W.S., ImageJ, NIH, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016) and the plugin 'Lipid Droplet Counter' (Moll S., http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:droplet_counter:start). For each genotype 6 images (20x magnification) of randomly selected microscopic fields were processed.

2.8 Cell cycle analysis of 3T3-L1 cells

For staining with Propidium iodide (PI), cells were trypsinized and fixed with 70% (vol/vol) ethanol in ddH₂O at indicated time-points. Cells were then treated with 0.1 mg/ml RNase A for 30 min at 37°C and incubated with 50 μg/ml PI. DNA content of single cells was quantified by flow cytometry analysis.

2.9 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP was performed using the Simple ChIP Kit according to the manufacturer's instructions (Cell Signaling Technology, 9003S). Briefly, the chromatin/DNA protein complexes were prepared from 3T3_Ctrl and 3T3_Jmjd1c cells 48h after adipogenic induction. After crosslinking (1% formaldehyde, 10 min) and quenching by addition of 0.125M glycine (5 min; room temperature), nuclei were purified and subjected to digestion with 7.5 μl of micrococcal nuclease (20 min at 37°C) to generate DNA fragments of 150-900 bp. The DNA-protein complexes were immunoprecipitated using ChIP grade antibodies against H3K9me1 (#14186, Cell Signaling) or H3K9me2 (ab1220, Abcam). Normal IgGs served as negative controls. Levels of DNA in the immunoprecipitates were analyzed by quantitative PCR and normalized to inputs. PCR primers were designed to amplify target sequences within -450bp of the respective transcriptional start sites. Primer sequences for ChIP-qPCR are shown in Table A.3. The average of three independent experiments is presented.

2.10 Statistics

If not indicated otherwise data is presented as mean±SEM of three or more independent experiments. Statistical significance has been tested via Welch's *t*-test or Mann-Whitney *U* test. Significance is displayed with * *p*<0.05 and ** *p*<0.001.

3. Results

3.1 Jmjd1c is expressed in peripheral metabolic tissues of C57BL/6 mice and responds to fasting and feeding.

To evaluate a potential role of JMJD1c in metabolism, we first analyzed *Jmjd1c* tissue expression in C57BL/6 mice. *Jmjd1c* was expressed in all studied tissues and showed especially robust expression in tissues of metabolic relevance, such as liver and white adipose tissue (WAT) (Figure 1A). To further investigate the role of *Jmjd1c* in metabolic processes we asked whether its expression is regulated by the nutritional status. Therefore we performed a fasting-refeeding experiment in which C57BL/6 mice were fasted for 24h and half of the cohort was re-fed for an additional period of 12h. Interestingly, *Jmjd1c* expression levels were significantly decreased in important metabolic tissues in the refeeding group (Figure 1B), with the strongest and most significant effect in WAT. Based on these results we hypothesized that JMJD1C may be a factor involved in metabolic processes, especially in WAT.

3.2 Jmjd1c expression is increased early during murine adipocyte differentiation.

To investigate the role of *Jmjd1c* during adipogenesis and its potential effects on adipocyte function we used the 3T3-L1 fibroblast-like cell line, which can be chemically induced to differentiate into adipocytes. Interestingly, *Jmjd1c* mRNA expression was increased early in the course of adipocyte differentiation, reaching a 4-fold maximum on day 3 of the induction phase (Figure 1C). A similar expression profile with an early increase of *Jmjd1c* expression was observed in the human preadipocyte cell line SGBS (Simpson-Golabi-Behmel syndrome) as well as in primary human preadipocytes during the course of adipocyte differentiation (Figure A.1).

3.3 Depletion of *Jmjd1c* impairs adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells.

Given our observation that *Jmjd1c* expression increased during adipogenesis, we next sought to determine effects of *Jmjd1c* depletion on the differentiation of 3T3-L1 cells. To this end, we used siRNA to transiently knock-down *Jmjd1c* in 3T3-L1 cells. *Jmjd1c* expression was reduced by 90% and a significant reduction was sustained over 7 days (Figure 1D) as determined by qPCR analysis. To evaluate differentiation efficiency, we performed Oil-Red O staining of neutral lipids in 3T3-L1 adipocytes at the end of differentiation (day 8). While fully differentiated 3T3-L1 cells transfected with non-targeting control siRNA (3T3_Ctrl) showed >90% Oil-Red O accumulation, 3T3-L1 cells transfected with *Jmjd1c*-specific siRNA (3T3_Jmjd1c) showed drastically diminished Oil-Red O accumulation (Figure 2A) and maintained a more fibroblast-like cell morphology (Figure A.2). The reduced accumulation of Oil-Red O was corroborated by measurement of intracellular triglyceride content (TG). TG content was reduced by ~50% in the 3T3_Jmjd1c cells (Figure 2B). Using a separate siRNA sequence targeting *Jmjd1c* (3T3_Jmjd1c_2) we confirmed the above phenotype. In 3T3_Jmjd1c_2 cells *Jmjd1c* expression was only reduced by 55% (Figure A.3 A). Consistent with the lower knockdown efficiency, we observed a more modest reduction of TG accumulation and Oil-red O staining (Figure A.3 B and C)

To gain insight into the molecular changes resulting from *Jmjd1c* knock-down, we performed expression profiling of relevant genes for adipocyte homeostasis and grouped them into lipid droplet surface proteins, lipases and transporters (Figure 2C). qPCR-analyses revealed significantly lower expression of Perilipins (especially *Plin4*) and *Cidea* in the 3T3_Jmjd1c cells. Genes coding for lipases showed diverse results in 3T3_Jmjd1c cells with significantly lower expression of *Atgl* (*Pnpla2*), a reduction of *Hsl* (*Lipe*) expression and no expression difference for *Lpl*. Furthermore, we observed significantly lower expression of glucose and fatty acid transporters, especially *Glut4* (*Slc2a4*) and *Fatp1* (*Slc27a1*), in 3T3_Jmjd1c cells. Changes in gene expression were replicated in 3T3_Jmjd1c_2 cells (Figure A.3 D). To test whether these changes in mRNA expression levels have functional relevance we sought to evaluate cellular alterations in these cells. Lipid droplets were stained with the fluorescent lipid dye AdipoRed and subsequently imaged using confocal laser scanning microscopy. Overall lipid droplets in 3T3_Jmjd1c cells were smaller in size, indicating less maturity (Figure 2D). This finding was also supported by quantification of lipid droplet volume using a computational algorithm in 3D-Stack images. Droplet volume and distribution

of PPAR γ and C/EBP β in 3T3_Jmjd1c cells on day 8 and diminished levels of C/EBP δ – the main transcription factor in early adipogenesis - on day 2 of cell differentiation as compared to the control cells (Figure 4B).

JMJD1C may facilitate target gene expression by removing the repressive H3K9me2 mark. Therefore, we examined H3K9me2 levels at differentially expressed genes by ChIP-qPCR assays in 3T3_Jmjd1c and 3T3_Ctrl cells. While the examined genes were marked by varied amounts of H3K9me2, we found consistently higher levels of the repressive H3K9me2 modification at the promotor regions of *Cebpa*, *Cebpb*, *Cebp δ* and *Ppar γ* in Jmjd1c depleted cells (Figure 4C). We also tested whether *Jmjd1c* depletion increases H3K9me1 levels at target genes, but did not detect significant differences (Figure 4C). Thus, the reduction of *Jmjd1c* increases H3K9me2 levels and may thereby prevent proper transcriptional activation of adipogenic regulators.

3.6 Depletion of *Jmjd1c* leads to impaired MCE during early adipogenesis in 3T3-L1 cells.

During the induction phase of 3T3-L1 adipogenesis a synchronous re-entry into cell cycle – called mitotic clonal expansion (MCE) – is mandatory for efficient subsequent differentiation [26]. MCE requires two complete rounds of cell cycle transition during the first three days of adipogenesis. Our data indicate that *Jmjd1c* is upregulated during the early phase of differentiation and might therefore participate in the process of MCE. We first analyzed whether depletion of *Jmjd1c* alters cell cycle transition under basal conditions. Hereunder, no differences of relative cell populations in G1-, S- and G2-Phase were observed between 3T3_Ctrl and 3T3_Jmjd1c cells. However, 1 day after the induction of differentiation (at the end of the first round of cell cycle transition), knock-down of *Jmjd1c* resulted in a reduced fraction of cells in S-Phase (10.6% versus 15.5%; 3T3_Jmjd1c versus 3T3_Ctrl) together with an increase of cells in G1-Phase (46% versus 34%; 3T3_Jmjd1c versus 3T3_Ctrl) – (Figure 4D). A similar distribution was observed at the end of the second round of cell cycle transition. These data suggest that *JMJD1C* promotes G1/S transition exclusively during the induction phase of adipocyte differentiation and could therefore be part of the MCE mechanisms. To further support this observation we performed gene expression analysis of selected cell cycle regulator genes. Expression of *Ccna2* (Cyclin A) and *Cdk2* (Cyclin dependent kinase 2) is increased during S-Phase transition [27; 26; 28]. Expression levels of those two genes were increased in 3T3_Ctrl cells that showed increased G1/S transition as compared to 3T3_Jmjd1c cells. In contrast, *Ccnd1* (Cyclin D1) is a characteristic of G1-Phase [27; 26; 28] and its expression was increased in the 3T3_Jmjd1c cells. Finally, a decrease in

were significantly shifted towards smaller-sized dimensions within the 3T3_Jmjd1c cells (Figure 2E).

To test whether altered activity of lipases contributes to the phenotype of 3T3_Jmjd1c cells, we performed lipolysis analysis, which however did not show any significant differences (Figure A.4).

3.4 3T3_Jmjd1c adipocytes show decreased uptake of fatty acids and glucose.

To determine if the reduced expression of glucose and fatty acid transporters results in functional differences between 3T3_Ctrl and 3T3_Jmjd1c cells, we next conducted uptake experiments for glucose and fatty acids, respectively. Under basal conditions no significant differences in glucose uptake were detected between 3T3_Ctrl cells and 3T3_Jmjd1c cells. However, induction of glucose uptake, following insulin stimulation, was significantly lower in 3T3_Jmjd1c cells as compared to 3T3_Ctrl cells. Insulin increased glucose uptake in 3T3_Ctrl cells by 7.5 fold, whereas in 3T3_Jmjd1c cells glucose uptake was only increased by 3.8 fold (Figure 3A). Likewise, 3T3_Jmjd1c cells also showed significantly reduced fatty acid uptake following insulin stimulation compared to 3T3_Ctrl cells (Figure 3B). These results are consistent with the lower *Fatp1* expression in 3T3_Jmjd1c cells, since the gene product FATP1 is the main responder in 3T3-L1 adipocytes to increase long chain fatty acid uptake upon insulin stimulation [25].

Altogether these results implicate that JMJD1C might play an important role in white adipocyte differentiation and that a depletion of *Jmjd1c* impairs the efficiency of adipogenesis and modulates basic homeostatic functions in fully differentiated adipocytes.

3.5 Altered expression of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells with *Jmjd1c* knock-down.

To explore potential molecular mechanisms for the impaired adipogenesis in 3T3_Jmjd1c cells, we measured expression levels of master transcriptional regulators of adipogenesis. Intriguingly, mRNA expression levels of the core adipogenic factors *Cebpa*, *Cebpb*, *Cebp δ* and *Ppar γ* were significantly reduced in 3T3_Jmjd1c cells. Furthermore, mRNA expression of downstream adipocyte marker genes *Fabp4* (Fatty acid binding protein 4) and *Adipoq* (Adiponectin) were significantly decreased in 3T3_Jmjd1c cells (Figure 4A and Figure A.3 E). These results were corroborated by Western Blot analyses showing reduced protein levels

Gas2 (growth arrest-specific protein 2) expression is required for irreversible post-mitotic growth arrest and subsequent adipocyte differentiation [29]. Interestingly, expression of *Gas2* was lower in 3T3_Ctrl than in 3T3_Jmjd1c cells (0.55 fold). These expression data corroborate the hypothesis that depletion of *Jmjd1c* impairs G1/S transition and thereby MCE, which is required for properly functioning adipogenesis (Figure 4E).

4. Discussion

In the present study we introduce JMJD1C, a putative histone demethylase, as a potential regulator of adipogenesis and white fat cell metabolism. We demonstrate that *Jmjd1c* expression in WAT responds to nutritional changes in C57BL/6 mice and that its expression is up-regulated early during murine 3T3-L1 adipocyte differentiation. Depletion of *Jmjd1c* in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis with the resulting adipocytes containing less intracellular triglycerides (TG) and smaller lipid droplets, as well as decreased uptake of glucose and fatty acids, respectively. *Jmjd1c* depleted cells showed impaired mitotic clonal expansion during early adipogenesis and reduced induction of adipogenic master regulators, associating with increased levels of the repressive H3K9me2 mark at their promotor regions. Collectively, these observations can provide a framework to explain how *Jmjd1c* depletion leads to the disturbance of this orchestrated process.

The jumonji C (JmjC) domain-containing family was originally identified as a cluster of chromatin-associated proteins that might be involved in demethylation of modified arginine and lysine residues in proteins, in particular histones [30; 31]. Histone modifications, such as the dynamic regulation of methylation and demethylation at specific residues influence a variety of biologic processes. For JmjC proteins a role in cellular differentiation, as well as in several malignancies and other diseases has been described [32; 10]. JMJD1C is a member of a subfamily of JmjC containing proteins, along with the histone demethylases JMJD1A, JMJD1B and HR (Hairless) [30]. For JMJD1C, histone demethylase activity was demonstrated for H3K9me2 and notably/furthermore dependent on the cellular environment and availability of specific co-factors [15; 16; 18].

JMJD1C has already been described to be involved in pluripotency, differentiation of spermatocytes and breast cancer [18; 16; 17; 33]. Recently, genome-wide association studies have identified genetic variants at the JMJD1C locus to be associated with plasma levels of TG, providing evidence for a potential role of JMJD1C in lipid homeostasis [19-21]. In this

study, we demonstrate for the first time that JMJD1C is implicated in adipogenesis and that its depletion is associated with impaired differentiation of murine adipocytes. It is inferable that JMJD1C acts as a differentiation factor that co-activates transcriptional programs that determine lineage and differentiation status. Likewise, several JMJD1C related enzymes (JMJD2B, JMJD6 and HR) have already been described to be required for proper white adipogenesis [12; 34; 13].

Upon depletion of *Jmjd1c* in 3T3-L1 cells, we observed a reduction of total cellular TG content and also noticed significantly smaller lipid droplets. This finding is consistent with the reduced expression of several lipid droplet surface genes. In particular, we noted an 86% lower expression of *Cidea* in 3T3_Jmjd1c cells. The Cidea protein/CIDEA is a major contributor to fusion processes of smaller lipid droplets in white adipocytes [35]. Depletion of *Cidea* has furthermore been associated with increased TG hydrolysis in adipocytes [36]. However, our data does not indicate that depletion of *Jmjd1c* affects lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.

In addition to lower expression of genes regulating lipid droplet formation, we also observed reduced expression of genes encoding for glucose and fatty acid transporters. Functional relevance of these transcriptional changes was corroborated by an impaired uptake of glucose and fatty acids in the 3T3_Jmjd1c adipocytes. It is conceivable that impaired uptake of glucose and fatty acids directly contributes to the formation of smaller lipid droplets and the reduction of total cellular TG. Future studies need to be carried out to investigate whether *Jmjd1c* depletion in mature adipocytes directly affects glucose and fatty acid uptake as well.

What may be the molecular mechanisms by which JMJD1C modulates differentiation of adipocytes? We demonstrate that *Jmjd1c* is upregulated during the induction phase of adipogenesis with an increase of up to 4-fold until day 3. The two major sequential events taking place during the induction phase of adipogenesis are a cell cycle program called mitotic clonal expansion (MCE) and the subsequent induction of adipogenic transcription factors [6; 7; 26], both of which events? were altered in 3T3_Jmjd1c cells. Hence, it is likely that *Jmjd1c* depletion interferes with these processes.

MCE is a prerequisite for proper adipogenesis, as demonstrated in 3T3-L cells, mouse embryonic fibroblasts and primary mouse preadipocytes [37; 26]. It consists of a synchronous re-entry into cell cycle in which cells are converted to a postmitotic state with irreversible growth arrest. During this phase C/EBP β gains DNA-binding and transactivation ability

enabling the subsequent cascade of adipogenesis [34; 38; 39]. Our study shows that *Jmjd1c* depletion, led to lower C/EBP β levels, deters cells from entering S-phase and consequently reduces cells in G2/M phase. Notably, JMJD2B has already been shown to affect adipogenesis in 3T3-L1 cells by functioning as a co-factor in MCE during the induction phase [34].

Apart from the altered cell-cycle distribution of 3T3_Jmjd1c cells, we could also show changes in expression levels of different cell-cycle regulating genes. 3T3_Jmjd1c cells showed reduced expression of *Cdk2* and *Cna2* (Cyclin A2) and increased expression of *Ccnd1* (Cyclin D1) and *Gas2*. Expression of *Cdk2* and *Cna2* is upregulated upon entry into S-Phase and pivotal for enabling C/EBP β DNA-binding activity in early adipogenesis. A disruption of this process prevents complete adipogenesis [27; 38]. Cyclin D1 gene expression is characteristic for cells in G1-Phase. In addition, increased *Ccnd1* expression has been shown to directly inhibit PPAR γ -mediated adipogenesis [28]. *Gas2* is a feature of reversible post-confluent growth arrest but not of irreversible post-mitotic growth arrest, which is required for subsequent adipocyte differentiation. Together our data suggest that JMJD1c depletion impairs MCE, which could partly be responsible for the resulting phenotype of *Jmjd1c* depleted adipocytes.

Moreover, we could demonstrate that the subsequent induction of key adipogenic transcription factors (C/EBPs and PPAR γ) was impaired in *Jmjd1c* depleted cells, both on mRNA and protein levels.

The reduced gene expression of *Cebpa*, *Cebpb* and *Ppar γ* correlated with increased levels of H3K9me2 at their promotor regions. Thus, Jmjd1c may participate in the induction of these genes by decreasing levels of H3K9me2, a silencing histone modification known to epigenetically repress gene transcription [40; 41]. Several studies established a critical role of site-specific histone methylations in adipogenesis and demonstrated that histone methyltransferases and demethylases control the expression of both positive and negative master regulators of adipogenesis [42; 43]. The impaired adipogenesis and maintenance of a more fibroblast-like morphology in 3T3_Jmjd1c cells is in line with work in germ cell and myeloid cell differentiation, in which depletion of *Jmjd1c* also reduced cell differentiation via epigenetic regulation of H3K9 methylation status [16; 14].

5. Conclusion

Our data indicate that JMJD1C acts as a proadipogenic factor and that depletion of *Jmjd1c* significantly impairs efficiency of adipogenesis in murine 3T3-L1 cells. Our study suggests multiple roles for JMJD1C in adipocyte differentiation, namely by regulating the induction of adipogenic transcription factors through H3K9me2 levels and by influencing mitotic clonal expansion that specifically occurs during the first phase of adipogenesis in 3T3-L1 cells. Future studies are warranted to gain detailed mechanistic insight, how JMJD1C is interconnected in these processes.

Acknowledgements:

This work was supported by grants from the German Research Council (DFG, SFB-1052/B07, /C07) and by the Leipzig Research Center for Civilization Diseases (LIFE). LIFE is funded by the European Union, by the European Regional Development Fund, the European Social Fund, and the Free State of Saxony within the framework of the excellence initiative. F.B. was supported by a scholarship of the Faculty of Medicine of the University of Leipzig. The authors would like to thank Nancy Schwagarus for excellent technical support and the Core Units of the Faculty of Medicine (Interdisciplinary Center for Clinical Research, University Leipzig).

Conflict of interest: All authors declare no conflicts of interest.

References:

- [1] Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847-853.10.1038/nature05483.
- [2] Rutkowski, J.M., Stern, J.H., Scherer, P.E., 2015. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 208:501-512.10.1083/jcb.201409063.
- [3] Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F. et al., 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet* 364:937-952.10.1016/s0140-6736(04)17018-9.
- [4] Haslam, D.W., James, W.P.T., 2005. Obesity. *The Lancet* 366:1197-1209.10.1016/s0140-6736(05)67483-1.

- [5] Poirier, P., Giles, T.D., Bray, G.A., Hong, Y., Stern, J.S., Pi-Sunyer, F.X. et al., 2006. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:968-976.10.1161/01.ATV.0000216787.85457.f3.
- [6] Cristancho, A.G., Lazar, M.A., 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:722-734.10.1038/nrm3198.
- [7] Rosen, E.D., MacDougald, O.A., 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896.10.1038/nrm2066.
- [8] Siersbaek, R., Nielsen, R., Mandrup, S., 2010. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism—novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett* 584:3242-3249.10.1016/j.febslet.2010.06.010.
- [9] Wu, Z., Bucher, N.L., Farmer, S.R., 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16:4128-4136.
- [10] Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Helin, K., 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* 22:1115-1140.10.1101/gad.1652908.
- [11] Tateishi, K., Okada, Y., Kallin, E.M., Zhang, Y., 2009. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* 458:757-761.10.1038/nature07777.
- [12] Kumpf, S., Mihilan, M., Goginashvili, A., Grandl, G., Gehart, H., Godel, A. et al., 2012. Hairless promotes PPARgamma expression and is required for white adipogenesis. *EMBO Rep* 13:1012-1020.10.1038/embor.2012.133.
- [13] Hu, Y.J., Belaghal, H., Hsiao, W.Y., Qi, J., Bradner, J.E., Guertin, D.A. et al., 2015. Transcriptional and post-transcriptional control of adipocyte differentiation by jumoni domain-containing protein 6. *Nucleic Acids Res* 43:7790-7804.10.1093/nar/gkv645.
- [14] Sroczynska, P., Cruickshank, V.A., Bukowski, J.P., Miyagi, S., Bagger, F.O., Wallriddsson, J. et al., 2014. shRNA screening identifies JMJD1C as being required for leukemia maintenance. *Blood* 123:1870-1882.10.1182/blood-2013-08-520994.
- [15] Chen, M., Zhu, N., Liu, X., Laurent, B., Tang, Z., Eng, R. et al., 2015. JMJD1C is required for the survival of acute myeloid leukemia by functioning as a coactivator for key transcription factors. *Genes Dev* 29:2123-2139.10.1101/gad.267278.115.
- [16] Kim, S.M., Kim, J.Y., Choe, N.W., Cho, I.H., Kim, J.R., Kim, D.W. et al., 2010. Regulation of mouse steroidogenesis by WHISTLE and JMJD1C through histone methylation balance. *Nucleic Acids Res* 38:6389-6403.10.1093/nar/gkq491.
- [17] Kuroki, S., Akiyoshi, M., Tokura, M., Miyachi, H., Nakai, Y., Kimura, H. et al., 2013. JMJD1C, a JmJC domain-containing protein, is required for long-term maintenance of male germ cells in mice. *Biol Reprod* 89:93.10.1095/biolreprod.113.108597.
- [18] Wang, J., Park, J.W., Drissi, H., Wang, X., Xu, R.H., 2014. Epigenetic regulation of miR-302 by JMJD1C inhibits neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 289:2384-2395.10.1074/jbc.M113.535799.
- [19] Chasman, D.I., Pare, G., Mora, S., Hopewell, J.C., Peloso, G., Clarke, R. et al., 2009. Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis. *PLoS Genet* 5:e1000730.10.1371/journal.pgen.1000730.
- [20] Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, L.M., Koseki, M. et al., 2010. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466:707-713.10.1038/nature09270.
- [21] Global Lipids Genetics, C., Willer, C.J., Schmidt, E.M., Sengupta, S., Peloso, G.M., Gustafsson, S. et al., 2013. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet* 45:1274-1283.10.1038/ng.2797.
- [22] Ge, K., Guermah, M., Yuan, C.X., Ito, M., Wallberg, A.E., Spiegelman, B.M. et al., 2002. Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417:563-567.10.1038/417563a.
- [23] Dignam, J.D., Martin, P.L., Shasthy, B.S., Roeder, R.G., 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101:582-598.

- [24] Burkhardt, R., Toh, S.A., Lagor, W.R., Birkeland, A., Levin, M., Li, X. et al., 2010. Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice. *J Clin Invest* 120:4410-4414.10.1172/JCI44213.
- [25] Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D., Lodish, H.F., 2002. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell* 2:477-488.
- [26] Tang, Q.Q., Otto, T.C., Lane, M.D., 2003. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:44-49.10.1073/pnas.0137044100.
- [27] Li, X., Kim, J.W., Gronborg, M., Uraib, H., Lane, M.D., Tang, Q.Q., 2007. Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBPbeta during adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11597-11602.10.1073/pnas.0703771104.
- [28] Fu, M., Rao, M., Bouras, T., Wang, C., Wu, K., Zhang, X. et al., 2005. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem* 280:16934-16941.10.1074/jbc.M500403200.
- [29] Shugart, E.C., Umek, R.M., 1997. Dexamethasone signaling is required to establish the postmitotic state of adipocyte development. *Cell Growth Differ* 8:1091-1098.
- [30] Klose, R.J., Kallin, E.M., Zhang, Y., 2006. JmJc-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7:715-727.10.1038/nrg1945.
- [31] Loenarz, C., Schofield, C.J., 2011. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci* 36:7-18.10.1016/j.tibs.2010.07.002.
- [32] Johansson, C., Tumber, A., Che, K., Cain, P., Nowak, R., Gileadi, C. et al., 2014. The roles of Jumonji-type oxygenases in human disease. *Epigenomics* 6:89-120.10.2217/epi.13.79.
- [33] Wolf, S.S., Patchev, V.K., Obendorf, M., 2007. A novel variant of the putative demethylase gene, s-JmJd1C, is a coactivator of the AR. *Arch Biochem Biophys* 460:56-66.10.1016/j.abb.2007.01.017.
- [34] Guo, L., Li, X., Huang, J.X., Huang, H.Y., Zhang, Y.Y., Qian, S.W. et al., 2012. Histone demethylase Kdm4b functions as a co-factor of C/EBPbeta to promote mitotic clonal expansion during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Death Differ* 19:1917-1927.10.1038/cdd.2012.75.
- [35] Christianson, J.L., Boutet, E., Puri, V., Chawla, A., Czech, M.P., 2010. Identification of the lipid droplet targeting domain of the Cidea protein. *J Lipid Res* 51:3455-3462.10.1194/jlr.M009498.
- [36] Xu, L., Zhou, L., Li, P., 2012. CIDE proteins and lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1094-1098.10.1161/ATVBAHA.111.241489.
- [37] Merkestein, M., Laber, S., McMurray, F., Andrew, D., Sachse, G., Sanderson, J. et al., 2015. FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat Commun* 6:6792.10.1038/ncomms7792.
- [38] Tang, Q.Q., Otto, T.C., Lane, M.D., 2003. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:850-855.10.1073/pnas.0337434100.
- [39] Zhang, Y.Y., Li, X., Qian, S.W., Guo, L., Huang, H.Y., He, Q. et al., 2011. Transcriptional activation of histone H4 by C/EBPbeta during the mitotic clonal expansion of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Biol Cell* 22:2165-2174.10.1091/mbcE10-11-0912.
- [40] Black, J.C., Van Rechem, C., Whetstone, J.R., 2012. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 48:491-507.10.1016/j.molcel.2012.11.006.
- [41] Kooistra, S.M., Helin, K., 2012. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:297-311.10.1038/nrm3327.
- [42] Ost, A., Pospisilik, J.A., 2015. Epigenetic modulation of metabolic decisions. *Curr Opin Cell Biol* 33:88-94.10.1016/j.cceb.2014.12.005.

- [43] Stiershaek, R., Nielsen, R., Mandrup, S., 2012. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23:56-64.10.1016/j.tem.2011.10.001.

Figure legends:

Figure 1: *Jmjd1c* mRNA expression in metabolic tissues of C57BL/6 mice and during adipocyte differentiation

(A) *Jmjd1c* shows ubiquitous mRNA expression in all tested tissues. (B) C57BL/6 mice have been fasted for 24h and half of the mice were refed for an additional period of 12h with regular chow diet. Relative mRNA expression of *Jmjd1c* between fasted and refed mice is displayed. (C) Murine 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes using DMEM, 10% FCS, 0.5mM IBMX, 0.25µM Dexamethasone, 1µg/ml Insulin, 2µM Rosiglitazone. (D) 3T3-L1 cells were transfected with Ambion Silencer Select siRNA against *Jmjd1c* (3T3_ *Jmjd1c*) or non-targeting control siRNA (3T3_ Ctrl). Quantitative Real-time PCR analysis of *Jmjd1c* mRNA is shown as mean±SEM and normalized to ng RNA (A) or beta-actin (*Actb*) (B-D). Statistical significance was assessed using Mann-Whitney *U* test (B) or Welch's *t*-test (D, C (point of reference day0)), **p*<0.05, ***p*<0.001, n.s. - non significant.

Figure 2: *Jmjd1c* depletion impairs maturation of 3T3-L1 adipocytes

(A) 3T3_ Ctrl and 3T3_ *Jmjd1c* cells were stained with Oil Red O on day 10 after induction of differentiation. (B) At the same time-point cellular lipids were extracted and triglycerides (TG) were quantified. Displayed bars represent TG content corrected for cell protein as mean±SEM. (C) Relative mRNA expression levels of selected adipocyte marker genes. Expression data are shown as mean±SEM and corrected for expression of housekeeping gene beta-actin (*Actb*). (D) Cells were stained with fluorescent neutral lipid stain AdipoRed and subsequently analyzed with a confocal laser scanning microscope. Representative images (40x magnification) are displayed for 3T3_ Ctrl and 3T3_ *Jmjd1c* cells. (E) Lipid droplet volume was quantified using 3D stack images and ImageJ software with the Plugin Lipid Droplet Counter. Displayed data shows bars representing mean droplet volume with 95% CI as well as a linear regression model of the histogram for relative fractions of the droplet volume. Statistical significance was assessed using Welch's *t*-test (C) and Mann-Whitney *U* test (B, E), **p*<0.05, ***p*<0.001; 3T3_ Ctrl (Non-targeting control), 3T3_ *Jmjd1c* (*Jmjd1c* specific knock-down)

Figure 3: Reduced uptake of fatty acids and glucose in 3T3-L1 adipocytes with knock-down of *Jmjd1c*

(A) Differentiated adipocytes were serum-starved overnight, incubated in low-glucose medium for 1h and subsequently treated with 3H-D-Glucose at a concentration of 500nCi/ml for 30 min. Cells were then harvested in RIPA buffer and activity was measured with a beta counter. Data are shown as mean±SEM. (B) Differentiated adipocytes were serum-starved for 1h before addition of BODIPY labeled fatty acids. Fatty acid uptake kinetics was measured on a fluorescence plate reader using BODIPY labeled fatty acids combined with a cell impermeable quencher. All experiments were carried out under basal conditions and in the presence of 100nM insulin, added 15 min before addition of glucose or fatty-acids. Cellular protein concentrations were used for normalization. Statistical significance was assessed using Mann-Whitney *U* test, **p*<0.05, ***p*<0.001; 3T3_ Ctrl (Non-targeting control), 3T3_ *Jmjd1c* (*Jmjd1c* specific knock-down).

Figure 4: *Jmjd1c* depletion alters cell cycle transition and reduces the expression of adipogenic transcription factors

(A) mRNA expression levels of adipogenic transcription factors and adipocyte marker genes in 3T3_ Ctrl and 3T3_ *Jmjd1c* cells. (B) Immunoblotting of nuclear proteins with antibodies against PPARγ, C/EBPβ on day 8 and C/EBPδ on day 2. TATA-box binding protein (TBP) was used as loading control. (C) ChIP-qPCR analyses of H3K9me1 (left panel) and H3K9me2 (right panel) levels of respective genes in 3T3_ Ctrl and 3T3_ *Jmjd1c* cells. Results are presented as ChIP/input DNA ratios (in percent) at the respective promoter regions. Chromatin was prepared 48h after adipogenic induction. (D) Relative fraction of cells in G2/M-, S- and G1-phase was assessed by flow cytometry analysis during the induction phase of adipogenesis. Cells were harvested at indicated time-points (pre – prior to induction; post day1/day2 after induction) and stained with propidium iodide (PI). (E) Relative mRNA expression levels of cell cycle marker genes were determined during the induction phase of adipogenesis. Expression data are shown as mean±SEM and corrected for expression of housekeeping gene beta-actin (*Actb*). Statistical significance was assessed using Welch's *t*-test, **p*<0.05, ***p*<0.001; 3T3_ Ctrl (Non-targeting control), 3T3_ *Jmjd1c* (*Jmjd1c* specific knock-down)

Figure 1

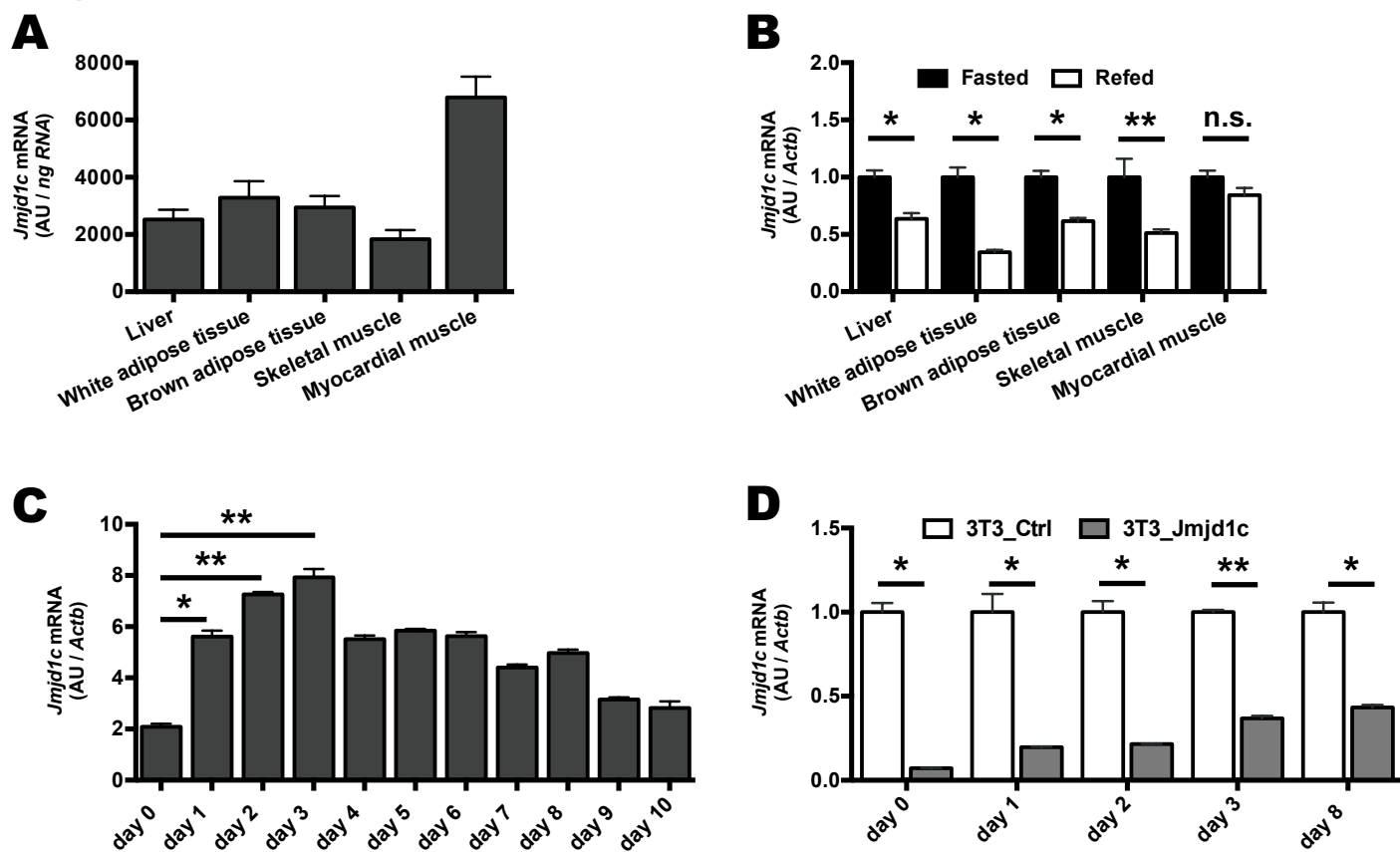


Figure 2

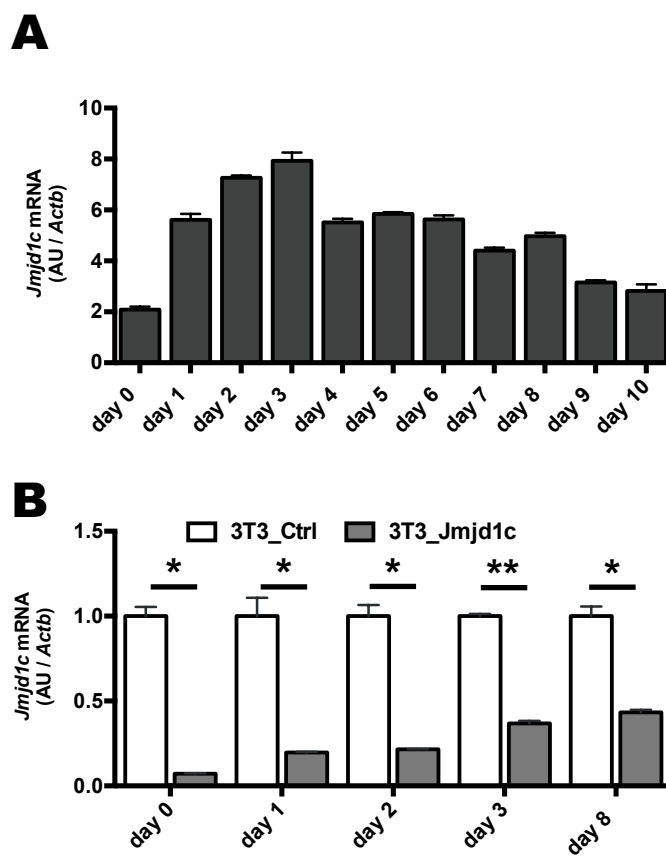
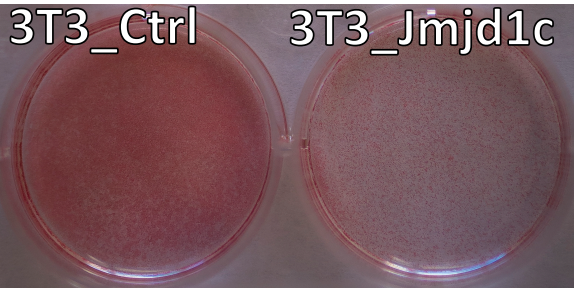
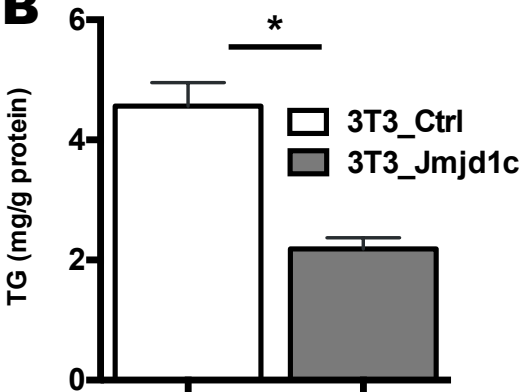


Figure 3

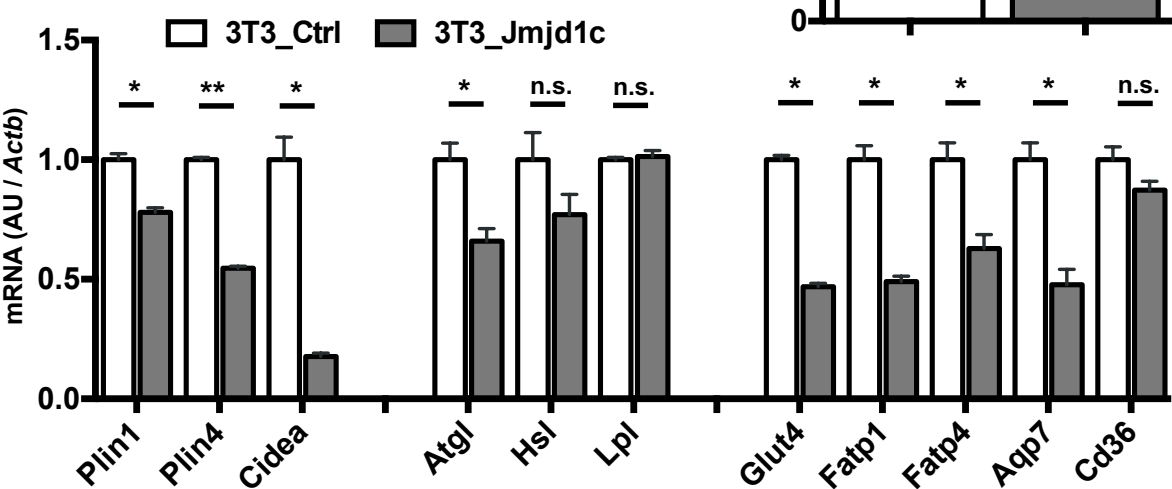
A



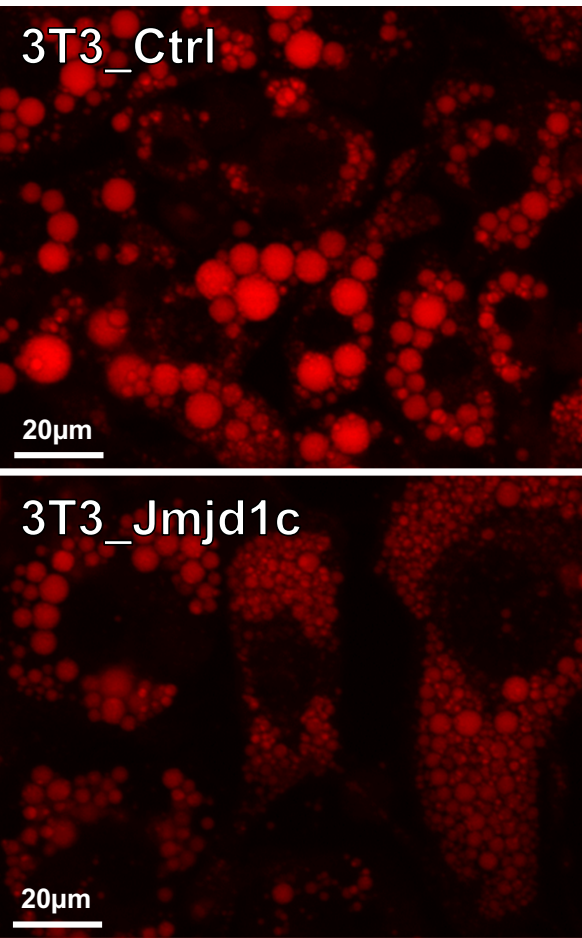
B



C



D



E

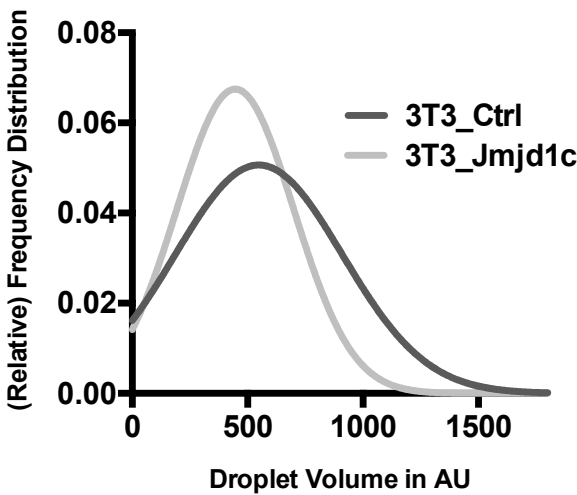
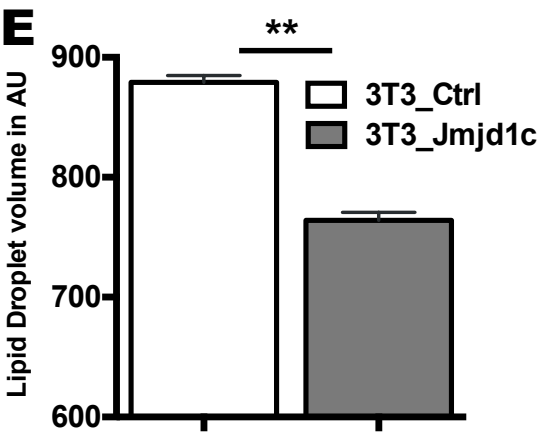


Figure 4

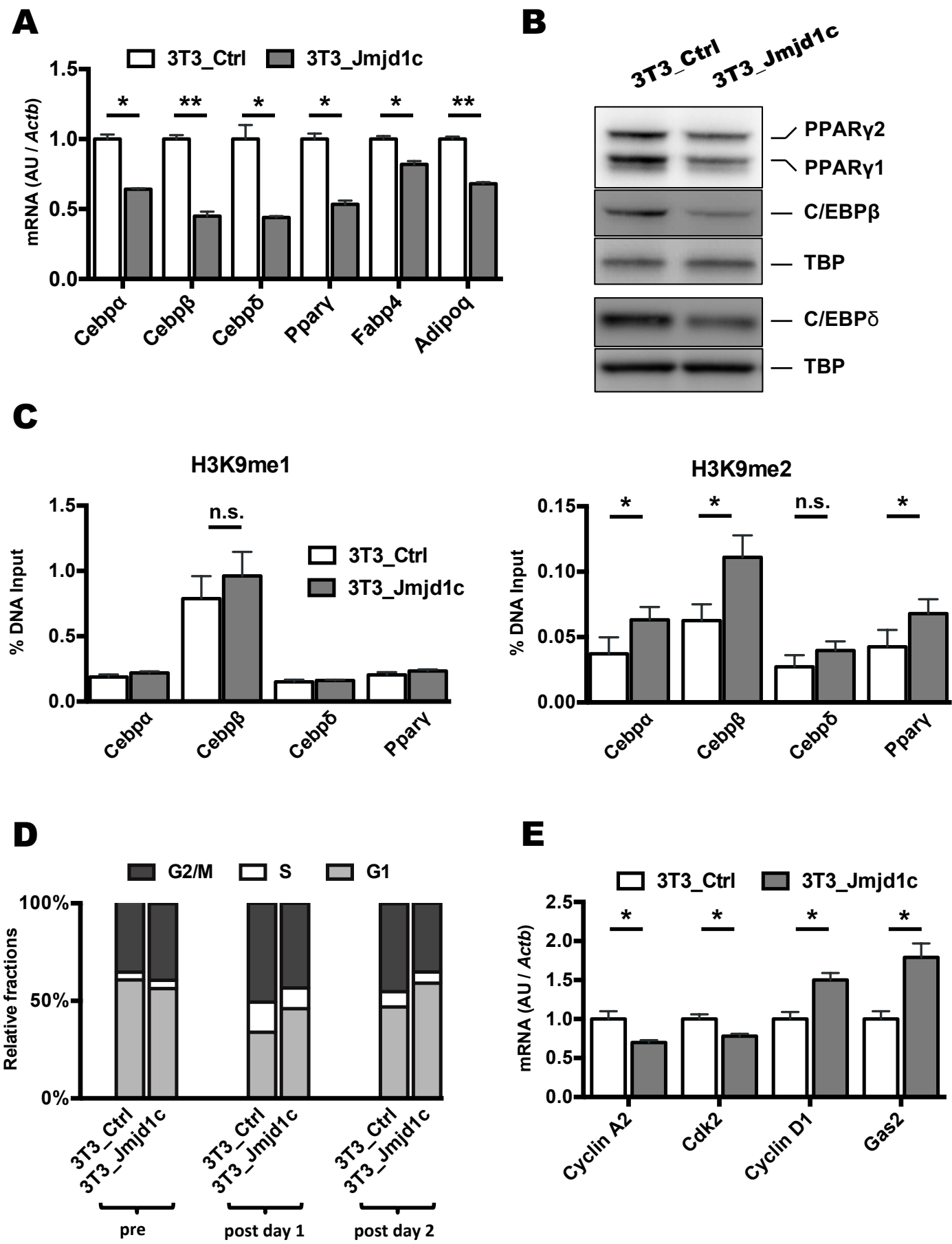
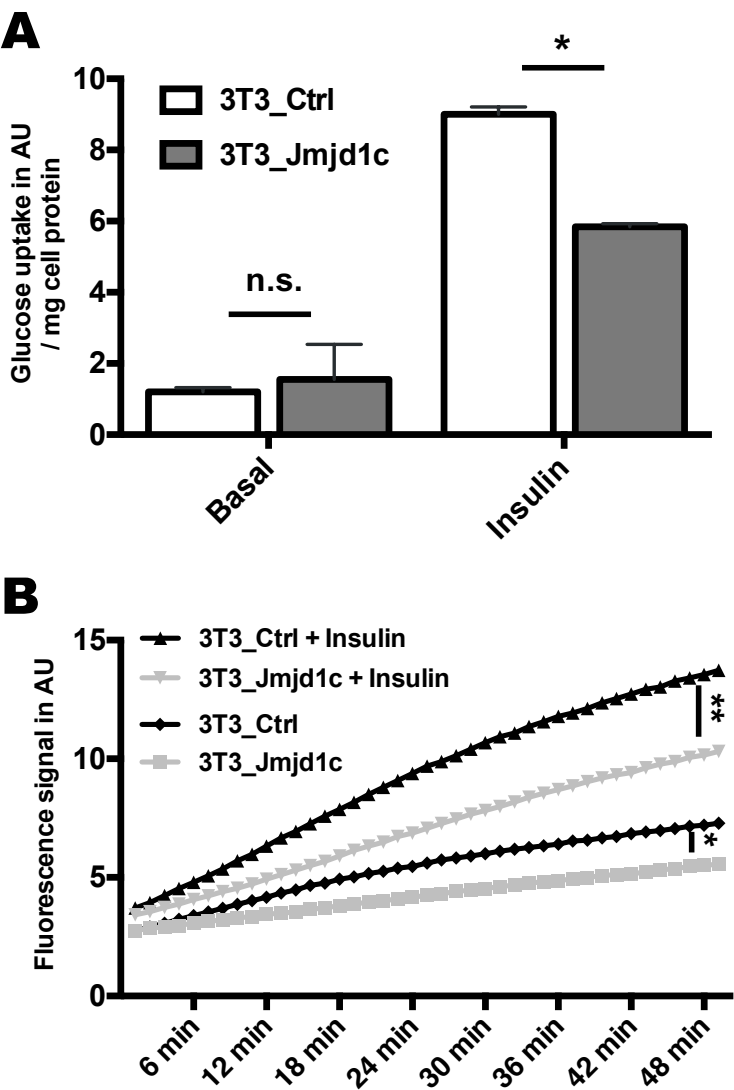


Figure 5



4 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades: Dr. med.

Funktionelle Charakterisierung des *Jmjd1c* Gens in der Adipogenese

eingereicht von: Florian Bürger

angefertigt am: Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie
und Molekulare Diagnostik,
Universitätsklinikum Leipzig AöR

betreut von: Prof. Dr. med. Ralph Burkhardt

eingereicht im: August 2017

Adipositas ist mit einer Vielzahl von Komorbiditäten, wie atherosklerotischen Gefäßerkrankungen, Diabetes mellitus und verschiedenen Malignomen assoziiert. Die Prävalenz adipöser Menschen weltweit hat sich in den letzten drei Dekaden verdoppelt [5, 7, 10, 77]. Charakteristisch ist die Akkumulation von weißem Fettgewebe (WAT), das den Hauptvertreter des Fettgewebes beim Menschen darstellt. Die Differenzierung von WAT, die sogenannte Adipogenese, ist ein komplexer und feinabgestimmter Prozess, der durch einige Hauptakteure und eine Vielzahl von Kofaktoren moduliert wird, deren Identität und Funktion bisher nur unvollständig verstanden ist. Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung neuer, die Adipogenese regulierender Faktoren kann zu einem besseren Verständnis der Biologie des Fettgewebes und letztlich zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen.

Die Adipogenese kann in zwei Phasen unterteilt werden – eine Phase der Determinierung der Entwicklungslinie (*Commitment*) und eine Phase der terminalen Differenzierung [22].

Mehrere Vertreter der *CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)*-Familie und der *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) gelten als die etablierten Hauptakteure der Adipogenese. C/EBP δ und C/EBP β sind zentrale Akteure in der *Commitment* Phase und aktivieren PPAR γ , das wiederum C/EBP α aktiviert. Letztere aktivieren gemeinsam eine Kaskade von adipozytenspezifischen Genen, deren Genprodukte den Phänotyp der Adipozyten ausprägen [23, 78, 79].

Die *jumonji C (JmjC)-domain-containing* Genfamilie umfasst mehr als 30 Mitglieder. JmjC-Proteine besitzen eine (Histon-) Demethylaseaktivität und sind durch transkriptionelle Regulation an der Zell- und Gewebsdifferenzierung beteiligt [57]. Mehrere Mitglieder der JmjC-Familie (JMJD1A, JMJD2B, JMJD6 und Hairless) konnten bereits mit der Adipozytenbiologie verknüpft werden [62, 64, 66, 67].

JMJD1C ist ein weiterer Vertreter der JmjC Familie, für den eine spezifische Demethylaseaktivität an H3K9me2 (Dimethylgruppen an Lysinresiduum 9 von Histon 3) demonstriert wurde [68, 71, 72]. Durch transkriptionelle Aktivierung seiner Zielgene moduliert JMJD1C die Entwicklung von Keimbahnzellen sowie verschiedene maligne Erkrankungen [68, 72, 73].

Vor kurzem lieferten genomweite Assoziationsstudien erstmals Belege für eine potentielle Funktion von JMJD1C im Lipidstoffwechsel: Genvarianten am JMJD1C-Lokus waren mit der Konzentration der Plasma-Triglyzeride assoziiert [74-76].

Bisher fehlen jedoch experimentelle Studien, die die Funktion von JMJD1C im Metabolismus untersucht haben. Da JMJD1C Prozesse der Zelldifferenzierung beeinflusst und eng verwandte Gene bereits mit der Adipozytenbiologie verknüpft werden konnten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die potentielle Rolle von JMJD1C für die Adipogenese und den Adipozyten-Stoffwechsel untersucht.

1. Jmjd1c ist in peripheren metabolischen Geweben der Maus exprimiert und wird durch Fasten und während der Adipogenese reguliert

In C57BL/6 Mäusen zeigte sich eine robuste Expression von *Jmjd1c* in metabolischen Geweben wie Leber und weißem Fettgewebe (WAT) (Figure 1A). *Refeeding* (Füttern im Anschluss an eine Hungerperiode von 24h) führte zu einer Reduktion der *Jmjd1c*-Expression. Die stärksten Expressionsunterschiede wurden im WAT festgestellt (Figure 1B). Basierend auf dieser Beobachtung wurde die Hypothese formuliert, dass JMJD1C an Stoffwechselprozessen, insbesondere im WAT, beteiligt ist. Daher wurde im folgenden die Expression von *Jmjd1c* während

der Differenzierung von murinen 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg der Expression zu Beginn der Differenzierung mit einem Maximum von circa 400% an Tag 3 (Figure 1C). Eine vergleichbare Dynamik der Expression konnte ebenfalls in primären murinen Adipozyten und einem humanen Zellmodell der Adipogenese (SGBS – Simpson-Golabi-Behmel Syndrom) detektiert werden (Appendix Figure A.1).

2. Die Depletion von *Jmjd1c* beeinträchtigt die Adipogenese in 3T3-L1 Zellen

Zur weiteren Untersuchung der Relevanz von JMJD1C für die Adipogenese wurde *Jmjd1c* mittels siRNA in 3T3-L1 Zellen transient depletiert (im folgenden 3T3_*Jmjd1c*). Es konnte eine effiziente Reduktion der Expression von *Jmjd1c* um initial 90% erreicht werden. Eine signifikante Reduktion der Expression um mehr als 50% blieb über den gesamten Verlauf der Differenzierung bestehen (Figure 1D).

Zur Evaluation der Effizienz der Differenzierung wurden verschiedene Untersuchungen zu Morphologie und Funktion der Adipozyten durchgeführt. Als Referenz wurden jeweils 3T3-L1 Zellen genutzt, die in gleicher Weise, jedoch mit einer unspezifischen *non target*-siRNA, behandelt wurden (im folgenden 3T3_Ctrl). Interessanterweise zeigten die *Jmjd1c* defizienten 3T3-L1-Zellen gegenüber den Kontrollzellen eine verringerte Effizienz der Differenzierung, die sich in einer Reduktion der Neutrallipide beziehungsweise Triglyzeride (TG) ausdrückte (Figure 2A, B). Weiterhin zeigten sich in den 3T3_*Jmjd1c* Zellen kleinere Lipidtröpfchen, deren Auftreten mit einem geringeren Reifungsgrad der Adipozyten assoziiert ist (Figure 2D, E). Um einen Einblick in die molekularen Veränderungen in *Jmjd1c* depletierten 3T3-L1 Zellen zu erhalten, wurde eine Expressionsanalyse von wichtigen adipozytären Genen durchgeführt. Diese zeigte in 3T3_*Jmjd1c* Zellen im Vergleich zu 3T3_Ctrl Zellen folgendes Muster:

- Eine geringere Expression von Genen, die an der Ausbildung und Funktion von Lipidtröpfchen beteiligt sind (*Plin1*, *Plin4*, *Cidea*)
- Eine geringere Expression von Genen, die für die Aufnahme von Substraten wie Glukose und Fettsäuren in die Adipozyten verantwortlich sind (*Glut4*, *Fatp1*, *Fatp4*, *Aqp7*)
- Keine eindeutigen Unterschiede in der Expression von Genen, die für Lipasen kodieren (*Atgl*, *Hsl*, *Lpl*)

3. 3T3_Jmjd1c Adipozyten nehmen weniger Glukose und Fettsäuren auf

Um die Relevanz dieser Expressionsdaten zu prüfen, erfolgten anschließend verschiedene funktionelle Experimente zur Aufnahme von Glukose und Fettsäuren. Diese wurden jeweils mit und ohne Insulinstimulation durchgeführt.

Für 3T3_Jmjd1c Zellen konnte gegenüber 3T3_Ctrl Zellen eine reduzierte Aufnahmefähigkeit von Fettsäuren nachgewiesen werden. Korrespondierend hiermit war eine geringere Expression von *Fatp1*, dessen Genprodukt FATP1 der wichtigste induzierbare Transporter für langkettige Fettsäuren nach Insulinstimulation ist (Figure 3B). Ebenso konnte für 3T3_Jmjd1c Zellen eine deutliche Reduktion der Aufnahmekapazität von Glukose gegenüber 3T3_Ctrl Zellen gezeigt werden. (Figure 3A).

4. Die Depletion von Jmjd1c führt zu Veränderungen des Histonmethylierungsstatus und einer geringeren Expression adipogener Transkriptionsfaktoren

Zur Untersuchung möglicher molekularer Mechanismen, die eine geringere Effizienz der Adipogenese in *Jmjd1c* depletierten 3T3-L1-Zellen erklären können, wurde die mRNA- und Protein-Expression verschiedener zentraler Transkriptionsfaktoren der Adipogenese untersucht. Hierbei zeigte sich sowohl eine Reduktion der früh wirkenden Faktoren C/EBP δ und C/EBP β wie auch der später wirkenden Faktoren PPAR γ und C/EBP α in 3T3_Jmjd1c Zellen (Figure 4A, B).

JMJD1C ist eine Histondemethylase, die durch Entfernung der repressiven Histonmodifikation H3K9me2 die Expression von Zielgenen aktivieren kann. Eine Depletion von *Jmjd1c* könnte somit zu einer geringeren transkriptionellen Aktivierung adipogener Transkriptionsfaktoren führen.

Diese Hypothese konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation in 3T3_Jmjd1c-Zellen bestätigt werden: Die Promotorbereiche von C/EBP δ , C/EBP β , PPAR γ und C/EBP α wiesen konsistent einen höheren H3K9me2 Methylierungsstatus auf (Figure 4 C).

5. Veränderungen der *mitotic clonal expansion* während der frühen Phase der Adipogenese in 3T3_*Jmjd1c* Zellen

Jmjd1c wird bereits in der frühen Phase der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen hochreguliert (Figure 1C). Daher wurde zusätzlich untersucht, ob JMJD1C im Rahmen der *mitotic clonal expansion* (MCE), einem zentralen Prozess der frühen Phase der Adipogenese, eine Rolle spielen könnte. Während der MCE findet ein synchrones (zweimaliges) Durchlaufen des Zellzyklus statt. Dieser Vorgang stellt eine unabdingbare Voraussetzung für eine effiziente Adipogenese dar. Interessanterweise führt die Depletion von *Jmjd1c* zu einer geringeren Zellzyklus-Progression, welche sich in den veränderten Fraktionen der G1- und S-Phase zeigt (Figure 4D). Diese Beobachtung legt nahe, dass JMJD1C an der Zellzyklus-Progression der *mitotic clonal expansion* in der frühen Adipogenese beteiligt ist. Diese Hypothese wird zusätzlich durch ein verändertes Expressionsprofil wichtiger Akteure des Zellzyklus gestützt (Figure 4E).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit JMJD1C erstmals als proadipogener Faktor identifiziert werden. Die Depletion von *Jmjd1c* in 3T3-L1 Zellen bewirkt eine signifikante Reduktion der adipozytären Differenzierungseffizienz. Die funktionellen Untersuchungen legen eine duale Rolle von JMJD1C nahe. Zum Einen scheint JMJD1C die Induktion von adipogenen Transkriptionsfaktoren durch die Reduktion der Histonmethylierungen (H3K9me2) in den betreffenden Promotorbereichen zu regulieren. Zum Anderen scheint JMJD1C die Prozesse des *mitotic clonal expansion* während der Induktionsphase der Differenzierung zu beeinflussen.

5 Literaturverzeichnis

1. WHO, *Obesity and overweight*. World Health Organization - Fact Sheet, 2016.
2. Collaborators, G.B.D.O., *Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years*. N Engl J Med, 2017.
3. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. The Lancet, 2014. **384**(9945): p. 766-781.
4. Lim, S.S., et al., *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
5. Haslam, D.W. and W.P.T. James, *Obesity*. The Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-1209.
6. Emdin, C.A., et al., *Genetic Association of Waist-to-Hip Ratio With Cardiometabolic Traits, Type 2 Diabetes, and Coronary Heart Disease*. JAMA, 2017. **317**(6): p. 626-634.
7. Poirier, P., et al., *Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(5): p. 968-76.
8. Lyall, D.M., et al., *Association of Body Mass Index With Cardiometabolic Disease in the UK Biobank: A Mendelian Randomization Study*. JAMA Cardiol, 2017.
9. Lauby-Secretan, B., et al., *Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group*. N Engl J Med, 2016. **375**(8): p. 794-8.
10. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 847-53.
11. Lau, D.C., et al., *Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(5): p. H2031-41.
12. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(8): p. 327-32.
13. Fasshauer, M. and M. Bluher, *Adipokines in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(7): p. 461-70.
14. Bluher, M. and C.S. Mantzoros, *From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century*. Metabolism, 2015. **64**(1): p. 131-45.
15. Wu, J., et al., *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
16. Sam, S., et al., *Relationship of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue with lipoprotein particle number and size in type 2 diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 2022-7.
17. Fox, C.S., et al., *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study*. Circulation, 2007. **116**(1): p. 39-48.
18. Abraham, T.M., et al., *Association between visceral and subcutaneous adipose depots and incident cardiovascular disease risk factors*. Circulation, 2015. **132**(17): p. 1639-47.

19. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 1-11.
20. Kloting, N. and M. Bluher, *Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome*. Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(4): p. 277-87.
21. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
22. Cristancho, A.G. and M.A. Lazar, *Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(11): p. 722-34.
23. Rosen, E.D. and O.A. MacDougald, *Adipocyte differentiation from the inside out*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 885-96.
24. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
25. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell Metab, 2006. **4**(4): p. 263-73.
26. Hwang, C.S., et al., *Adipocyte differentiation and leptin expression*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 231-59.
27. Rosen, E.D., et al., *Transcriptional regulation of adipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1293-307.
28. Linhart, H.G., et al., *C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12532-7.
29. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.
30. Freytag, S.O., D.L. Paielli, and J.D. Gilbert, *Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells*. Genes Dev, 1994. **8**(14): p. 1654-63.
31. Rosen, E.D., et al., *C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 22-6.
32. Wu, Z., et al., *Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity*. Mol Cell, 1999. **3**(2): p. 151-8.
33. Hamm, J.K., et al., *Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **892**: p. 134-45.
34. Tanaka, T., et al., *Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene*. EMBO J, 1997. **16**(24): p. 7432-43.
35. Hamm, J.K., B.H. Park, and S.R. Farmer, *A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18464-71.
36. Tang, Q.Q. and M.D. Lane, *Adipogenesis: from stem cell to adipocyte*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 715-36.
37. MacDougald, O.A. and M.D. Lane, *Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 345-73.

38. Zhang, J.W., et al., *Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4471-8.
39. Lane, M.D., Q.Q. Tang, and M.S. Jiang, *Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(3): p. 677-83.
40. Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane, *CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 850-5.
41. Tang, Q.Q., et al., *Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9766-71.
42. Davis, L.A. and N.I. Zur Nieden, *Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2658-74.
43. Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane, *Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 44-9.
44. Zhang, Y.Y., et al., *Transcriptional activation of histone H4 by C/EBPbeta during the mitotic clonal expansion of 3T3-L1 adipocyte differentiation*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(13): p. 2165-74.
45. Merkestein, M., et al., *FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6792.
46. Sarjeant, K. and J.M. Stephens, *Adipogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a008417.
47. Hansen, J.C., *Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2002. **31**: p. 361-92.
48. Carruthers, L.M. and J.C. Hansen, *The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 37285-90.
49. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
50. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
51. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
52. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-20.
53. Papp, B. and J. Muller, *Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins*. Genes Dev, 2006. **20**(15): p. 2041-54.
54. Musri, M.M., R. Gomis, and M. Parrizas, *A chromatin perspective of adipogenesis*. Organogenesis, 2010. **6**(1): p. 15-23.
55. Musri, M.M., et al., *Histone demethylase LSD1 regulates adipogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(39): p. 30034-41.
56. Klose, R.J., E.M. Kallin, and Y. Zhang, *JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(9): p. 715-27.
57. Cloos, P.A., et al., *Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease*. Genes Dev, 2008. **22**(9): p. 1115-40.

58. Chang, B., et al., *JMJD6 is a histone arginine demethylase*. Science, 2007. **318**(5849): p. 444-7.
59. Johansson, C., et al., *The roles of Jumonji-type oxygenases in human disease*. Epigenomics, 2014. **6**(1): p. 89-120.
60. Liu, Z., et al., *Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2758-70.
61. Ye, L., et al., *Histone demethylases KDM4B and KDM6B promotes osteogenic differentiation of human MSCs*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(1): p. 50-61.
62. Guo, L., et al., *Histone demethylase Kdm4b functions as a co-factor of C/EBPbeta to promote mitotic clonal expansion during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes*. Cell Death Differ, 2012. **19**(12): p. 1917-27.
63. Okada, Y., K. Tateishi, and Y. Zhang, *Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity*. J Androl, 2010. **31**(1): p. 75-8.
64. Tateishi, K., et al., *Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 757-61.
65. Inagaki, T., et al., *Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice*. Genes Cells, 2009. **14**(8): p. 991-1001.
66. Kumpf, S., et al., *Hairless promotes PPARgamma expression and is required for white adipogenesis*. EMBO Rep, 2012. **13**(11): p. 1012-20.
67. Hu, Y.J., et al., *Transcriptional and post-transcriptional control of adipocyte differentiation by Jumonji domain-containing protein 6*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(16): p. 7790-804.
68. Kim, S.M., et al., *Regulation of mouse steroidogenesis by WHISTLE and JMJD1C through histone methylation balance*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(19): p. 6389-403.
69. Nakajima, R., H. Okano, and T. Noce, *JMJD1C Exhibits Multiple Functions in Epigenetic Regulation during Spermatogenesis*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163466.
70. Kuroki, S., et al., *JMJD1C, a JmjC domain-containing protein, is required for long-term maintenance of male germ cells in mice*. Biol Reprod, 2013. **89**(4): p. 93.
71. Wang, J., et al., *Epigenetic regulation of miR-302 by JMJD1C inhibits neural differentiation of human embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2014. **289**(4): p. 2384-95.
72. Chen, M., et al., *JMJD1C is required for the survival of acute myeloid leukemia by functioning as a coactivator for key transcription factors*. Genes Dev, 2015. **29**(20): p. 2123-39.
73. Sroczynska, P., et al., *shRNA screening identifies JMJD1C as being required for leukemia maintenance*. Blood, 2014. **123**(12): p. 1870-82.
74. Global Lipids Genetics, C., et al., *Discovery and refinement of loci associated with lipid levels*. Nat Genet, 2013. **45**(11): p. 1274-83.
75. Teslovich, T.M., et al., *Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids*. Nature, 2010. **466**(7307): p. 707-13.
76. Chasman, D.I., et al., *Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis*. PLoS Genet, 2009. **5**(11): p. e1000730.
77. Rutkowski, J.M., J.H. Stern, and P.E. Scherer, *The cell biology of fat expansion*. J Cell Biol, 2015. **208**(5): p. 501-12.

78. Siersbaek, R., R. Nielsen, and S. Mandrup, *PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies*. FEBS Lett, 2010. **584**(15): p. 3242-9.
79. Wu, Z., N.L. Bucher, and S.R. Farmer, *Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4128-36.

6 Anlagen

6.1 Supplemental Material

Appendix Table A.1

Human qPCR primer sequences

Gene	Orientation	5'→3' direction
<i>JMJD1C</i>	Forward	CCTACAATGAATGGTGTATCTC
<i>JMJD1C</i>	Reverse	GAGACTCAGGCATGCAC
<i>ACTB</i>	Forward	CCTGGCACCCAGCACAAT
<i>ACTB</i>	Reverse	GCCGATCCACACGGAGTACTT

Appendix Table A.2

Murine qPCR primer sequences

Gene	Orientation	5'→3' direction
<i>Jmjd1c</i>	Forward	GCCAACGTTAAGGAGTTCTGG
<i>Jmjd1c</i>	Reverse	TCTTCATATCTTGTGTCATCATGG
<i>Actb</i>	Forward	GTGCGTGACATCAAAGAG
<i>Actb</i>	Reverse	GCCACAGGATTCCATACC
<i>Plin4</i>	Forward	GGACCCTTTACCCTGACTGG
<i>Plin4</i>	Reverse	AAACTGCTCAAGGTCTTGCC
<i>Aqp7</i>	Forward	CAAACCCCTGCCCTACTGAC
<i>Aqp7</i>	Reverse	AGTAGGTTCTCTGAAGTGCTCTG
<i>Plin1</i>	Forward	AGATCCCGGCTCTTCAATACC
<i>Plin1</i>	Reverse	AGAACCTTGTCAGAGGTGCTT
<i>Hsl</i>	Forward	GGCTCACAGTTACCATCTCACC
<i>Hsl</i>	Reverse	GAGTACCTTGCTGTCCTGTCC
<i>Atgl</i>	Forward	CAACGCCACTCACATCTACGG
<i>Atgl</i>	Reverse	TCACCAGGTTGAAGGAGGGAT
<i>Ccnd1</i>	Forward	GGGTGGGTTGGAAATGAAC
<i>Ccnd1</i>	Reverse	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG
<i>Cebpδ</i>	Forward	GTTAGGCCAACTGTTCTCCG
<i>Cebpδ</i>	Reverse	TAAGGAGATGGACGCGTTTC
<i>Gas2</i>	Forward	CAGATAGCCAGCGAAGGTC
<i>Gas2</i>	Reverse	CAAGTGCCCAACCAAGTTC
<i>Fatp1</i>	Forward	TGCTTTGGTTTCTGGGAC
<i>Fatp1</i>	Reverse	CACGAATCAGAACAGAGAGG
<i>Fatp4</i>	Forward	GAGAGCTTTGCACAGACCTTG

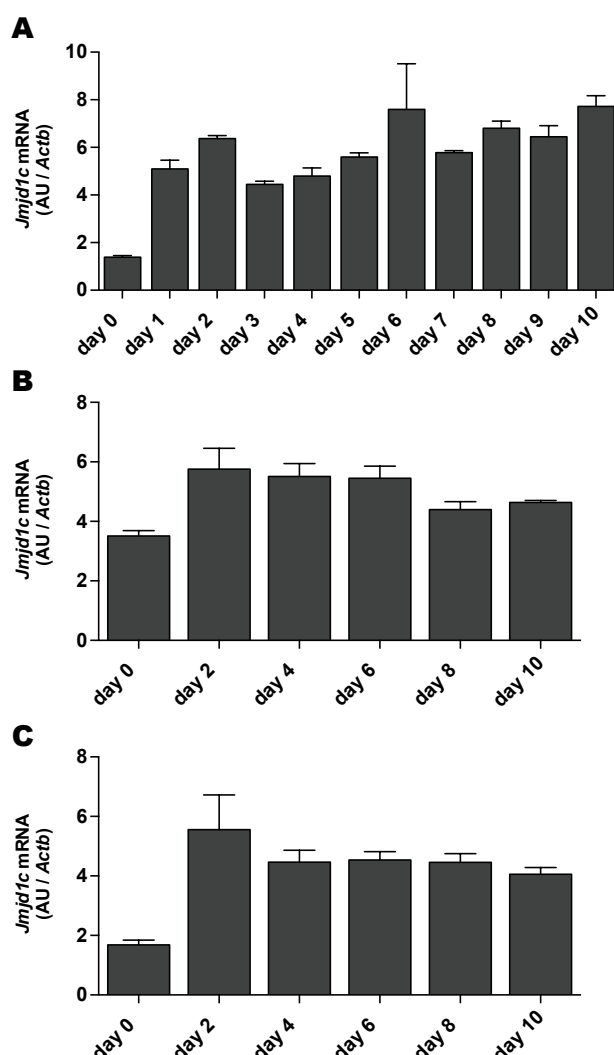
<i>Fatp4</i>	Reverse	CCTTCCGCAACTCTGTCTTC
<i>Cdk2</i>	Forward	AAATTCATGGATGCCTCTGC
<i>Cdk2</i>	Reverse	ACGGTGAGAATGGCAGAAAG
<i>Ccna2</i>	Forward	AGAGTGTGAAGATGCCCTG
<i>Ccna2</i>	Reverse	GTGGTGATTCAAACTGCCA
<i>Cidea</i>	Forward	TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT
<i>Cidea</i>	Reverse	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
<i>Lpl</i>	Forward	GGACTGAGAATGGCAAGCAA
<i>Lpl</i>	Reverse	CCACTGTGCCGTACAGAGAAA
<i>Glut4</i>	Forward	CAGTGTTCAGTCACTCGCT
<i>Glut4</i>	Reverse	CAGCGCCTGAGTCTTTTCTT
<i>Cd36</i>	Forward	TGGTGATGTTTGTTGCTTTTATGAT
<i>Cd36</i>	Reverse	GCTCATCCACTACTTATTTTCCATTCT
<i>Cebpβ</i>	Forward	CAAGCTGAGCGACGAGTACAA
<i>Cebpβ</i>	Reverse	GACAGCTGCTCCACCTTCTTC
<i>Cebpa</i>	Forward	GTCACTGGTCAACTCCAGCA
<i>Cebpa</i>	Reverse	TGGACAAGAACAGCAACGAG
<i>Pparγ</i>	Forward	TCGCTGATGCACTGCCTATG
<i>Pparγ</i>	Reverse	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Ap2</i>	Forward	AAGGTGAAGAGCATCATAACCCT
<i>Ap2</i>	Reverse	TCACGCCTTTCATAACACATTCC
<i>Adipoq</i>	Forward	GCAAGCTCTCCTGTTCTCTTAATC
<i>Adipoq</i>	Reverse	TGCATCTCCTTTCTCTCCCTTCTC

Appendix Table A.3

ChIP-qPCR primer sequences

Gene	Orientation	5'→3' direction
<i>Cebpa</i>	Forward	TTGCGCCACGATCTCTCTC
<i>Cebpa</i>	Reverse	CTTAGAGCCCGCCTTCTCCT
<i>Cebpβ</i>	Forward	GGCTGCTTCCAGGGAATTGG
<i>Cebpβ</i>	Reverse	CAGCTACACGACCCCAACC
<i>Cebpδ</i>	Forward	GGGTTCGAATTTTCAGGAGGCT
<i>Cebpδ</i>	Reverse	CGAGACCAGAACTAGTGAACCG
<i>Pparγ</i>	Forward	CCACTGGTGTGTATTTTACTGCAA
<i>Pparγ</i>	Reverse	GTTCTGTGAGGGGCGTGAA

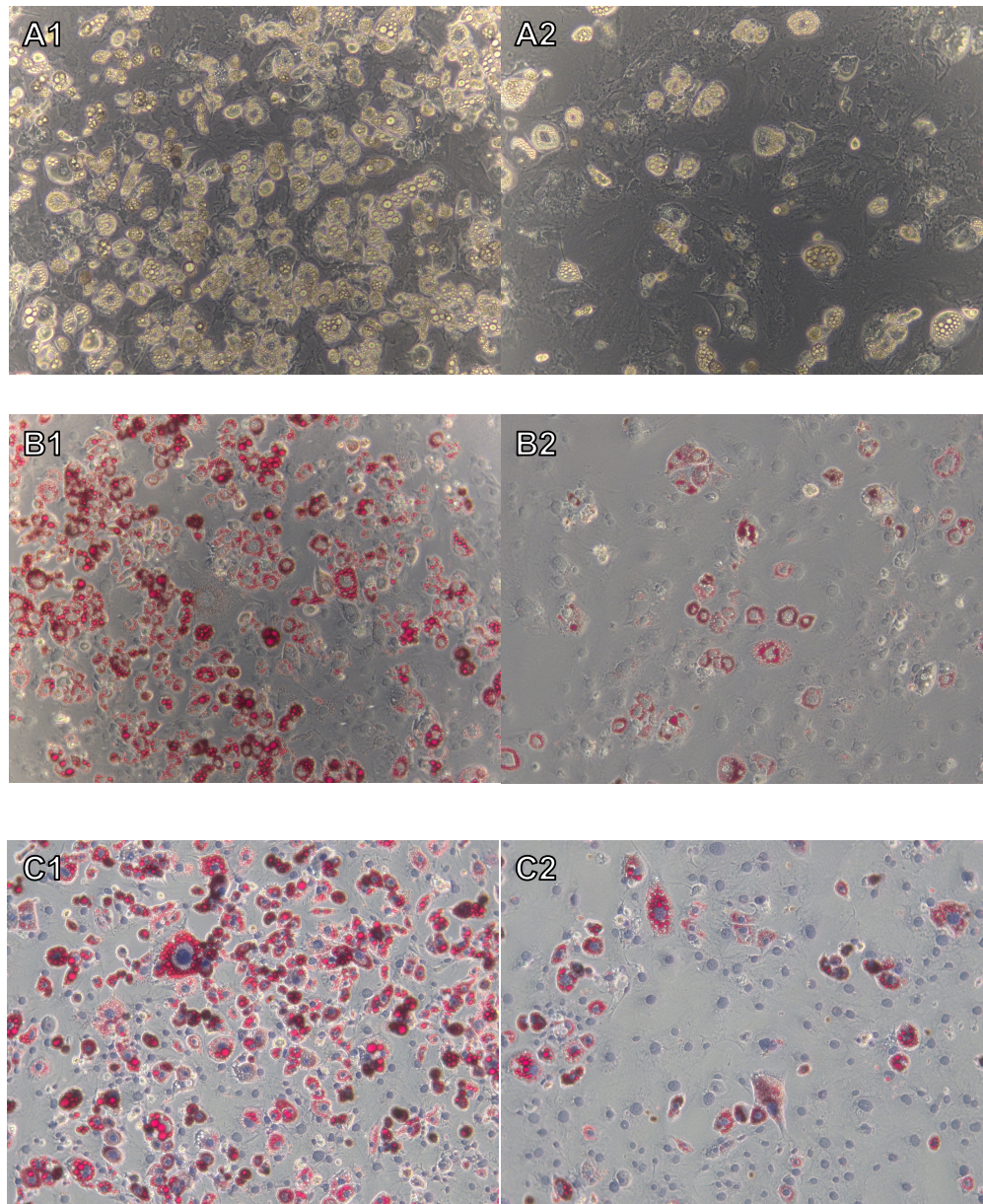
Appendix Figure A.1



Appendix Figure A.1

At indicated time-points RNA was collected and used for Quantitative Real-time PCR analysis. Data are shown as mean+SEM and corrected for expression of housekeeping gene beta-actin (*Actb*). (A) Confluent human SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-syndrome) cells were differentiated into adipocytes using DMEM-F12 supplemented with 8 mg/l biotin, 4 mg/l pantothenate, 10 µg/ml transferrin, 20 nM insulin, 100 nM hydrocortisone, 200 pM triiodothyronine, 25 nM dexamethasone, 0.5mM IBMX, 2µM Rosiglitazone. (B) Subcutaneous preadipocytes of a 47 years old female and (C) visceral preadipocytes of a 60 years old male were purchased from LONZA, cultured and differentiated into adipocytes according to the LONZA instructions (Poietics™ ‘Human Subcutaneous/Visceral Preadipocytes’) using ‘Preadipocyte Growth Medium-2’ and ‘Adipocyte Differentiation Medium’ containing insulin, dexamethasone, indomethacin and isobutyl-methylxanthine.

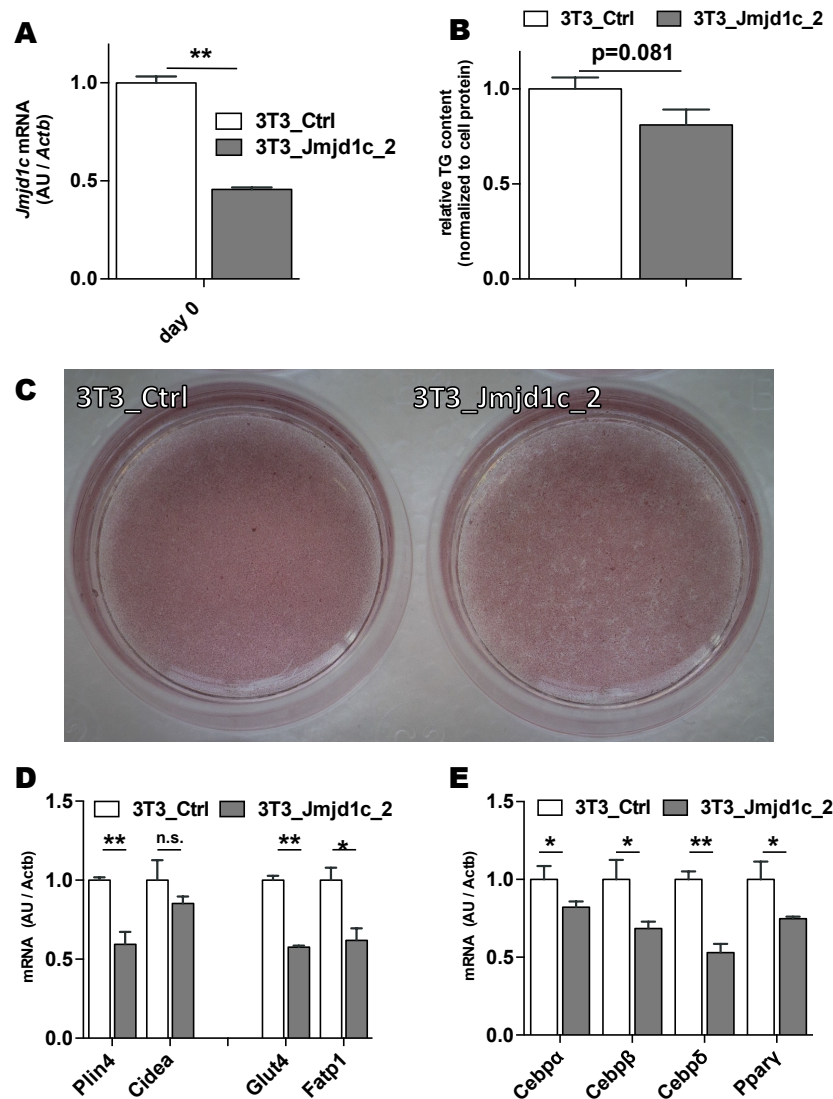
Appendix Figure A.2



Appendix Figure A.2

On day 10 of the adipocyte differentiation 3T3-L1 cells were stained with Oil Red O to display neutral lipids. Light microscopic images were taken with a Zeiss Primavert at 10x magnification. Column 1 displays images of 3T3_Ctrl cells (Non-targeting control) and Column 2 displays images of 3T3_Jmjd1c (*Jmjd1c* specific siRNA). (A) Native images. (B) Oil Red O staining. (C) Oil Red O and haematoxylin staining.

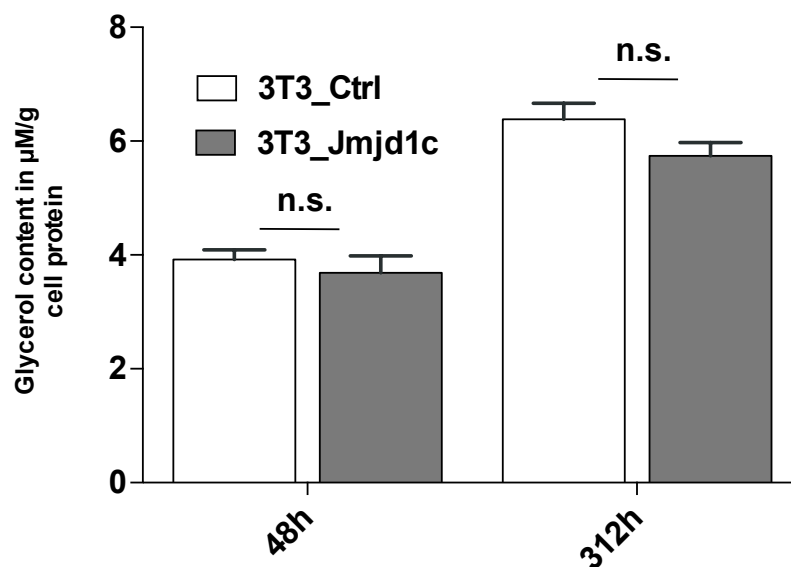
Appendix Figure A.3



Appendix Figure A.3

Quantitative Real-time PCR analysis of mRNA expression is shown as mean+SEM and corrected for expression of housekeeping gene beta-actin (*Actb*). (A) 3T3-L1 cells were transfected with Ambion Silencer Select siRNA against *Jmjd1c* (3T3_Jmjd1c_2) or non-targeting control siRNA (3T3_Ctrl). (B) On day 8 after the induction of differentiation cellular lipids of 3T3_Ctrl and 3T3_Jmjd1c_2 cells were extracted and triglycerides (TG) were quantified. Displayed bars represent TG content corrected for cell protein as mean+SEM. (C) At the same time-point 3T3_Ctrl and 3T3_Jmjd1c_2 cells were stained with Oil Red O. (D) Relative mRNA expression levels of selected adipocyte marker genes. (E) Relative mRNA expression levels of adipogenic transcription factors. Statistical significance was assessed using Mann-Whitney *U* test (B) or Welch's *t*-test (A,D,E), **p*<0.05, ***p*<0.001, n.s. - non significant.

Appendix Figure A.4



Appendix Figure A.4





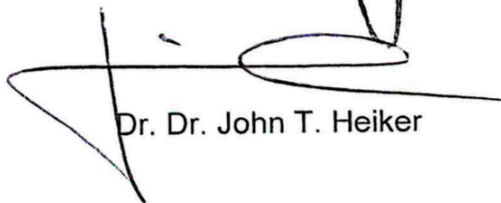
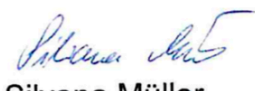
3T3-L1 adipocytes were stimulated with 10 μ M isoproterenol in DMEM, containing 2% BSA (FA-free) for 60 min at 37°C. Cells were subsequently washed, lysed and free glycerol content was determined using Free glycerol reagent (F6428, Sigma). Cell protein content was quantified using the BCA method and used for normalization of free glycerol content. Data are shown as mean+SEM, 3T3_Ctrl (Non-targeting control), 3T3_Jmjd1c (*Jmjd1c* specific knock-down).

6.2 Erklärung über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden zur Publikation

Diese von mir, Florian Bürger, angefertigte Dissertation beruht maßgeblich auf den Ergebnissen, die folgender Publikation zu Grunde liegen:

Buerger F, Muller S, Ney N, Weiner J, Heiker JT, Kallendrusch S, Kovacs P, Schleinitz D, Thiery J, Stadler SC, Burkhardt R. Depletion of Jmjd1c impairs adipogenesis in murine 3T3-L1 cells. Biochim Biophys Acta. 2017;1863(7):1709-17.

Ich habe im September 2011 begonnen im Institut für Laboratoriumsmedizin Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig zu arbeiten und innerhalb der ersten zwei Monate die Grundtechniken des molekularbiologischen, proteinbiochemischen Arbeitens sowie Zellkulturtechniken erlernt und war in der folgenden Zeit in der Lage, diese in selbstständiger Arbeit umzusetzen. Die Konzeption aller experimentellen Schritte, die Eingang in die Publikation erhalten haben, habe ich in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Burkhardt durchgeführt. Die für die folgenden Abbildungen verwendeten Daten habe ich vollständig oder zum Großteil erhoben: 1 A-D, 2 A-E, 3 A-B, 4 A und E. Die Daten, welche den Abbildungen 4 B und D zu Grunde liegen, habe ich jeweils zu etwa 50% selbst erhoben. An der Akquise der Daten der Abbildung 4 C war ich nur konzeptionell aber nicht experimentell beteiligt. Den Großteil der Auswertung aller Daten habe ich in Rücksprache mit Herrn Prof. Dr. Burkhardt selbstständig und eigenverantwortlich durchgeführt. Die Erstellung des Manuskripts erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Burkhardt und Frau Dr. Stadler. Ich habe hauptverantwortlich an der Erstellung aller Paragraphen, inklusiver der Diskussion, mitgewirkt und sämtliche Abbildungen eigenständig erstellt. Zusammenfassend habe ich neben Herrn Prof. Dr. Burkhardt den Großteil der Arbeit dieser Publikation geleistet.

 Prof. Dr. Ralph Burkhardt	 Prof. Dr. Joachim Thiery	 Dr. Sonja C. Stadler
 Prof. Dr. Peter Kovacs	 Dr. Dr. John T. Heiker	 Silvana Müller

6.3 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

6.4 Lebenslauf

6.6 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralph Burkhardt, der mich mit einer gesunden Mischung aus Anleitung und Freiheit zur eigenen Entwicklung durch alle Etappen des Promotionsprojektes von der Themenorientierung über die Konzeptionierung und Durchführung der Experimente bis hin zur Verfassung eines Publikationsmanuskriptes führte. Im Laufe der vergangenen Jahre ist er zu einem geschätzten Freund und Ratgeber in vielen Bereichen geworden und ich hoffe, auch bei Divergenz der fachlichen Wege, auf eine freundschaftliche und kollegiale Verbundenheit in der Zukunft.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Thiery für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten, die dieser Dissertation zu Grunde liegen, in dem von ihm geleiteten Institut durchführen zu können. Außerdem war er entscheidend an der Inspiration und Konzeption des Promotionsprojektes beteiligt und war stets ein gewissenhafter und konstruktiver Ratgeber.

Außerdem danke ich Frau Dr. Sonja Stadler für Ihre stete Unterstützung bei der Planung und Durchführung von Experimenten sowie ihrer akribischen und pointierten Sicht, die bei der Erstellung von Präsentationen oder Manuskripten eine entscheidende Hilfe gewesen ist.

Ein großer Dank gilt der bedingungslosen und nicht selbstverständlichen Hilfe von Frau Silvana Müller, Frau Nancy Schwagarus und Frau Nadja Ney, welche in unterschiedlichen Phasen der experimentellen Arbeit ein unverzichtbarer Grundpfeiler waren.

Darüberhinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik für sechs Jahre mit vielen kritischen und konstruktiven Diskussionen, fairer und offener Unterstützung, lehrreichen Einweisungen und Fortbildungen sowie unzähligen erheiternden und erbaulichen Gesprächen und einer ehrlichen und angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig danke ich für die Unterstützung, insbesondere in Form des Promotionsstipendiums.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich über den gesamten Prozess der Konzeption, experimentellen Arbeit und Verfassung des Publikationsmanuskriptes wie der Dissertation mit Geduld und Rat begleitet haben.